

TREBALL FI DE GRAU

**Grau en Enginyeria Biomèdica**

# **MODIFICACIÓ DE LA SUPERFÍCIE DEL TITANI AMB ATAC ÀCID I SILANITZACIÓ PER PRODUIR EFECTE ANTIBACTERIÀ**



## **Memòria i Annexos**

<b>Autor:</b>	Poqui Sallés, Laia
<b>Director:</b>	Guillem Martí, Jordi
<b>Co-Director:</b>	Manero Planella, José M.
<b>Convocatòria:</b>	Maig 2019



## Resum

En el present Treball de Final de Grau es fa un estudi d'una possible tècnica de millora de la integració dels implants dentals de titani amb el teixit cel·lular, i tracta específicament l'opció de crear una superfície de titani el més antibacteriana possible.

Mitjançant un atac de caràcter àcid, la superfície del titani queda modificada creant una nanoestructura que segons l'article *Surface Nanoporosity has a greater influence on osteogenic and bacterial cell adhesion than crystallinity and wettability* [1] esdevé antibacteriana. Així doncs, l'objectiu del projecte és replicar aquesta superfície que per si sola és antibacteriana i a més a més, tal com diu l'altre article *Anhydride-functional silane immobilized onto titanium surfaces induces osteoblasts cell differentiation and reduces bacterial adhesion and biofilm formation* [2], afegir un silà anomenat TESPSA que també té un efecte antibacterià; de forma que amb la combinació d'ambdós efectes, poder obtenir una superfície del titani idònia, pel seu caràcter antibacterià, pels implants dentals.

Com a objectiu extra del projecte, s'intenta, també, optimitzar el temps de producció de la superfície de titani creada segons el primer dels articles [1].

Per a dur a terme aquest projecte cal un treball de laboratori que consta en la preparació de mostres de titani llises, fer sobre elles un atac àcid amb una solució anomenada *Piranha*, silanitzar les mostres amb TESPSA, fer una caracterització de la superfície atacada i finalment, realitzar assaigs amb bacteris amb l'objectiu de verificar si es tracta d'una superfície antibacteriana o no.

A l'hora de procedir amb aquest treball de laboratori, s'ha pogut fer tot el proposat, tot i que els resultats d'alguns assajos no han estat els esperats. L'intent de rèplica de la superfície del titani de l'article de Rodriguez-Contreras, et al. 2018 [1], no ha resultat en la superfície antibacteriana esperada. De totes formes, s'ha procedit amb el projecte usant una variant de superfície que es va extreure a partir d'una variació en l'atac amb *Piranha*, per verificar l'efectivitat antibacteriana del TESPSA.

## Resumen

En el presente Trabajo de Final de Grado se hace un estudio de una posible técnica de mejora de la integración de los implantes dentales de titanio con el tejido celular, y trata específicamente la opción de crear una superficie de titanio lo más antibacteriana posible.

Mediante un ataque de carácter ácido, la superficie del titanio queda modificada creando una nanoestructura que según el artículo *Surface Nanoporosity has a greater influence on osteogenic and bacterial cell adhesion than crystallinity and wettability* [1] se convierte en antibacteriana. Así pues, el objetivo del proyecto es replicar esta superficie que por si sola es antibacteriana y además, tal como dice el otro artículo *Anhydride-functional silane immobilized onto titanium surfaces induces osteoblast cell differentiation and reduces bacterial adhesion and biofilm formation* [2], añadir un silano llamado TESPSA que también tiene un efecto antibacteriano; de forma que con la combinación de ambos efectos, poder obtener una superficie del titanio idónea, por su carácter antibacteriano, para los implantes dentales.

Como objetivo extra del proyecto, se intenta, también, optimizar el tiempo de producción de la superficie de titanio creada según el primero de los artículos [1].

Para llevar a cabo este proyecto es necesario un trabajo de laboratorio que consta en la preparación de muestras de titanio lisas, hacer sobre ellas un ataque ácido con una solución llamada *Piranha*, silanizar las muestras con TESPSA, hacer una caracterización de la superficie atacada y finalmente, realizar ensayos con bacterias para verificar si se trata de una superficie antibacteriana o no.

A la hora de proceder con este trabajo de laboratorio, se ha podido hacer todo lo propuesto, aunque los resultados de algunos ensayos no han sido los esperados. El intento de réplica de la superficie del titanio del artículo de Rodríguez-Contreras, et al. 2018 [1], no ha resultado en la superficie antibacteriana esperada. De todas formas, se ha procedido con el proyecto usando una variante de superficie que se extrajo a partir de una variación en el ataque con *Piranha*, para verificar la efectividad antibacteriana del TESPSA.

## Abstract

In the present Final Degree Project, a study is made of a possible technique to improve the integration of titanium dental implants with cellular tissue, and specifically deals with the option of creating a titanium surface as antibacterial as possible.

Through an attack of acid behavior, the surface of the titanium is modified, creating a nanostructure that according to the article *Surface Nanoporosity has a greater influence on osteogenic and bacterial cell adhesion than crystallinity and wettability* [1] it becomes antibacterial. Thus, the objective of the project is to replicate this surface, which is antibacterial itself, and, as the other article says, *Anhydride-functional silane immobilized onto titanium surfaces induces osteoblast cell differentiation and reduces bacterial adhesion and biofilm formation* [2], add a silane called TESPSA that also has an antibacterial effect; so that with the combination of both effects, to be able to obtain a suitable surface of titanium, for its antibacterial behavior, for dental implants.

As an extra objective for the project, it is also tried to achieve an optimization of the producing time of the titanium surface created following the first of the articles [1].

To carry out this project it is necessary a laboratory work that consists in the preparation of smooth titanium samples, to make an acid attack on them with a solution called *Piranha*, to silanize the samples with TESPSA, to make a characterization of the attacked surface, and finally, carry out tests with bacteria to verify if it is an antibacterial surface or not.

When proceeding with this laboratory work, it has been possible to do everything proposed, although the results of some assays have not been as expected. The attempt to replicate the titanium surface of the article by Rodriguez-Contreras, et al. 2018 [1], has not resulted in the expected antibacterial surface. In any case, we proceeded with the project using a variant of surface that was extracted from a variation in the attack with Piranha, to verify the antibacterial effectiveness of TESPSA.



## Agraïments

En primer lloc m'agradaria agrair l'esforç del director del projecte Jordi Guillem Martí, per la seva dedicació i disposició a l'ajuda sempre que ho he necessitat. El seu suport i el fet que hagi estat proper, ha fet que la feina fos més fàcil i amena. També voldria agrair l'esforç de direcció del co-director del projecte, José Maria Manero, qui juntament amb el Jordi, m'ha guiat durant tot el procés.

De la mateixa forma, agraeixo a l'Aina Heras, L'Elena Falgueras i la Júlia Arrizabalaga el suport al laboratori, les seves explicacions i els seus consells.

Finalment, m'agradaria agrair a la meua família, parella i amics els ànims i ajuda que m'han brindat al llarg del grau i en especial aquest últim tram.





# Índex

<b>RESUM</b>	<b>I</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>II</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>III</b>
<b>AGRAÏMENTS</b>	<b>V</b>
<b>1. PREFACI</b>	<b>1</b>
1.1. Motivació .....	1
1.2. Requeriments previs .....	1
<b>2. INTRODUCCIÓ</b>	<b>3</b>
2.1. El titani.....	3
2.1.1. Característiques .....	4
2.1.2. Ús del titani .....	6
2.1.3. Limitacions del titani en el camp mèdic.....	7
2.2. Tractaments superficials al titani.....	8
2.2.1. Efecte antibacterià .....	9
2.2.2. Complexitats amb el disseny experimental .....	9
2.3. Abast del treball.....	10
<b>3. MARC EXPERIMENTAL</b>	<b>11</b>
3.1. Materials i Metodologia .....	11
3.1.1. Preparació de les mostres .....	11
3.1.2. Atac a les mostres .....	13
3.1.3. Caracterització de la superfície .....	15
3.1.4. Silanització.....	18
3.1.5. Assajos amb bacteris .....	19
3.1.6. Càlculs estadístics.....	23
<b>4. RESULTATS</b>	<b>25</b>
4.1. Primera Etapa .....	25
4.1.1. Caracterització de la superfície .....	25
4.1.2. Assajos amb bacteris .....	30
4.2. Segona Etapa .....	36
4.2.1. Caracterització de la superfície .....	37
4.2.2. Assajos amb bacteris .....	40

4.3. Tercera etapa .....	43
4.3.1. Assajos amb bacteris .....	44
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>51</b>
<b>5. ANÀLISI DE L'IMPACTE AMBIENTAL .....</b>	<b>53</b>
<b>6. ANÀLISI ECONÒMICA .....</b>	<b>55</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>59</b>





# **1. PREFACI**

## **1.1. Motivació**

Aquest projecte neix al Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica (CMEM) de la Universitat Politècnica de Catalunya, el qual realitza recerca i docència en l'àrea de la ciència i la tecnologia dels materials i les seves aplicacions; i s'ha dut a terme concretament al BBT (Biomaterials, Biomecànica i Enginyeria de Teixits).

L'àmplia recerca en el món dels implants dentals i la seva integració al cos humà d'aquest grup, fa aparèixer constantment dubtes i possibles respostes que cal provar experimentalment. D'aquesta manera, s'han obert i s'obren investigacions que cal anar avançant i ampliant contínuament dins del grup.

L'interès desenvolupat en les assignatures de Biomaterials (BMTB) i Biologia (BB), afegit al fet de poder posar en pràctica els coneixements apresos en aquestes, i el fet de poder participar en un estudi ja existent que cal continuar mitjançant recerca, són els tres punts clau que van encaminar la meua elecció per aquest projecte.

## **1.2. Requeriments previs**

És necessari per al desenvolupament del projecte l'experiència i coneixement en l'àrea dels biomaterials. El camp de la caracterització de superfícies és de vital importància, però sobretot ho és el coneixement de la documentació sobre els avenços duts a terme en aquesta branca fins a dia d'avui.



## 2. INTRODUCCIÓ

Tot i la immensa feina i el gran esforç de la recerca, el problema de les infeccions en implants biomèdics continua existint. La fabricació de catèters, implants de tota mena, i tot tipus d'objecte biomaterial introduït al cos, avui dia està subjecte a la colonització dels bacteris a la seva superfície, cosa que fa d'aquest, un problema greu a tractar, ja que sovint una infecció implicarà una re-operació i substitució del dispositiu implantat, i uns costos monetaris majors pel sistema sanitari i pel pacient.

Es creu que les infeccions en fase tardana no són causades per l'acte de l'operació en si, sinó per bacteris que circulen pel sistema sanguini. Les espores que aterren en algun punt no curat del tot, s'adhereixen a la superfície de l'implant, es multipliquen i formen un biofilm molt difícil de mitigar pel sistema immunològic i que, per tant, segurament acabi en infecció [3].

És per això que el tractament de superfícies de dispositius biomèdics s'ha convertit en una forta necessitat per a la mitigació de l'efecte bacterià als implants, amb tècniques com tractaments químics de superfícies o rugositats superficials que fan desfavorable la fixació de bacteris.

Alguns polímers són coneguts per matar bacteris [4]–[6] i altres per evitar que els bacteris s'uneixin [7]–[9], però sovint aquests polímers no són adequats per a fabricar aparells biomèdics, ja que en altres termes com la resistència o la flexibilitat no ho poden ser. Així, s'usen aquests polímers per a un recobriments dels implants, fabricats d'algun altre material.

Per altra banda, una altra forma de fer que la superfície del dispositiu sigui més antibacteriana és modificant l'arquitectura de la seva superfície; modificant la seva topografia. De totes formes, el paper que la micro-topografia i la nano-topografia prenen en el control de la fixació bacteriana encara no està completament caracteritzat [10], i és un afer que avui dia està prenent moltíssima importància i reconeixement.

### 2.1. El titani

En aquest projecte es treballa amb discs de titani pur per a fer les mostres sobre les quals es duran a terme tots els assajos, i és per això que cal saber coses sobre aquest metall.

Es tracta del quart element més abundant a la terra i va ser descobert per William Gregor, clergue i geòleg, l'any 1791, quan va trobar-ne presència a la ilmenita (mineral). Al 1795, el químic Martin Heinrich Klaproth, va redescobrir aquest metall i li va donar el nom pel qual el coneixem avui dia. A partir d'aquell moment, va començar el repte de la seva extracció dels minerals que el contenien, ja que no és possible fer-ho de la forma habitual (si es calenta amb carboni es forma el carbur de titani)

[11]. Per tant, es van crear processos especials que a partir de 1950 van fer que el titani passés de ser una curiositat de laboratori a un important metall estructurat produït comercialment [12].

### 2.1.1. Característiques

Es tracta d'un metall lleuger de color gris platejat que abunda a la natura i es pot reciclar. És resistent a la corrosió (motiu pel qual és usat en implants biomèdics) i a la oxidació, i es tracta d'un metall paramagnètic, és a dir, que no s'ima. A part, és un metall de poca conductivitat elèctrica i tèrmica.

En quant a les seves característiques mecàniques, el titani és un material mal-leable, dúctil i dur, que presenta resistència a la tracció i una gran tenacitat. Finalment cal dir que té una gran memòria de forma i permet tractaments termoquímics i superficials.

El mòdul elàstic del titani és molt similar al de l'os humà, i gràcies a la seva constant dielèctrica s'hi adhereix bé. Es tracta, com es pot veure, un metall idoni per a ser implantat.

#### 2.1.1.1. Propietats mecàniques

El titani presenta diferents graus segons la seva puresa, tot i que també poden presentar aliatges. Les propietats mecàniques d'aquest canviaran segons de quin grau es tracti, a l'igual que amb els aliatges. De totes formes, l'aliatge que es fa servir més sovint en medicina és Ti6Al4V (conté 6% d'alumini i 4% de vanadi). A continuació es presenta una taula amb els quatre graus del titani pur i l'aliatge esmenat i les seves respectives propietats mecàniques [13]:

Tipus	Límit Elàstic (MPa)	Resistència Màxima (MPa)	Elongació (%)	E (GPa)
Ti grau 1	170	240	24	102,7
Ti grau 2	275	345	20	102,7
Ti grau 3	380	450	18	103,4
Ti grau 4	485	550	15	104,1
Ti6Al4V	825-869	895-930	6-10	110-114

*Taula 1: Propietats mecàniques dels graus de titani*

Paral·lelament, cal dir que les estructures de titani tenen un límit de fatiga que garanteix la durada per a les seves diverses aplicacions, fet pel qual es tracta d'un material de gran ús.



### 2.1.1.2. Biocompatibilitat

Donada la definició de biomaterial: material dissenyat per interactuar amb sistemes biològics amb la finalitat d'avaluar, tractar, augmentar o substituir algun teixit, òrgan o funció del cos; l'estudi de la biocompatibilitat s'entén com la descripció i caracterització d'una resposta reproducible per part del teixit biològic als materials estudiats [14].

És possible definir quatre tipus de biomaterials segons la resposta de l'organisme [15]:

- Fase 1: Inert. Materials implantables que generen poca o cap resposta.
- Fase 2: Interactiu. Materials implantables que estan dissenyats per generar una resposta específica o beneficiosa.
- Fase 3: Viable. Materials implantables, possiblement amb incorporació de cèl·lules vives, que són tractats per l'organisme com a teixit normal. Són reabsorbits o remodelats pocs cops.
- Fase 4: Replant. Materials implantables que consisteixen en teixit natiu, desenvolupat in vitro a partir de cèl·lules prèviament obtingudes del pacient.

En el cas dels metalls, si estan en contacte directe amb el teixit, llavors és pràcticament segur que es produirà algun tipus d'alliberació de ions [14], expulsant l'agent metàl·lic. Els metalls en contacte amb algun fluid biològic, s'oxiden i pateixen un procés de ionització, cosa que fa que la capa atòmica més externa pateixi canvis, i la unió amb la següent capa d'àtoms (no oxidats) quedi modificada. Llavors, aquesta segona capa d'àtoms metàl·lics s'allibera a l'organisme. Aquests àtoms alliberats per l'organisme, canvien l'estructura de les proteïnes i fan que el cos les classifiqui com a agents externs, cosa que provoca una reacció del sistema.

Amb el titani passa que la unió entre la primera i la segona capa dels àtoms no queda modificada per la oxidació de la primera, sinó que es manté estable, de forma que els àtoms de la segona capa no seran alliberats a l'organisme. Això fa al titani invisible al nostre sistema.

En definitiva, el titani és un element biocompatible ja que els teixits de l'organisme toleren la seva presència sense que hi hagi reaccions al·lèrgiques del sistema immunitari.

És la seva propietat de biocompatibilitat, juntament amb la seva duresa, lleugeresa i resistència que han fet que el titani s'utilitzi en un gran ventall d'aplicacions, entre les quals estan les aplicacions mèdiques.

### 2.1.2. Ús del titani

Àmpliament usat en molts àmbits de la indústria avui dia, el titani és un element del qual, com s'ha dit prèviament, se n'aprofiten la seva lleugeresa, la seva duresa i la seva resistència a la corrosió, entre d'altres. Alguns dels usos en les indústries més punteres en l'actualitat són els següents:

- En la indústria aeroespacial el titani esdevé útil també gràcies a la seva resistència a altes temperatures, a part de per la seva relació resistència-pes. S'usa per a peces i elements de subjecció de l'avió. Així mateix, resulta útil per a la producció de motors de turbina de gasos, fulles de compressor, carcasses i proteccions per la calor.
- Per a l'enginyeria oceànica el titani resulta útil degut a la seva resistència a la corrosió. D'aquesta manera, molts productes fets amb aquets material s'han emprat per a la dessalinització d'aigua de mar, així com a les embarcacions i l'exploració dels recursos de l'oceà.
- El titani ofereix moltes atraccions per a ús en aplicacions automobilístiques. Malgrat els seus avantatges, però, encara no ha aconseguit un ús generalitzat, ja que es tracta d'un element car; tot i que està despertant interès per a algunes aplicacions. S'hi inclouen dins d'aquest camp les vàlvules de motor, les barres de connexió i els fixadors de la vàlvula.
- A la Xina el titani s'utilitza principalment en aplicacions químiques, com ara intercanviadors de calor, ànodes de titani, contenidors de titani i altres.
- El titani també té aplicacions en termes recreatius, inclosos equipaments esportius com bicicletes, pals de golf i raquetes de tennis. El full i el cable de titani són ara també alternatives a altres metalls en la joieria.
- Finalment, els usos mèdics del titani, que s'expliquen en el següent apartat del projecte.

#### 2.1.2.1. Aplicacions mèdiques

Degut a la seva alta biocompatibilitat el titani és usat extensament en el camp de la medicina, sobretot en implants ortopèdics i dentals.

Els **implants ortopèdics** s'utilitzen per la substitució de teixits durs, generalment os. Existeixen diversos sistemes d'osteosíntesi com fixadors externs, plaques, claus-placa, cargols... i el material més usat per aquestes aplicacions és l'acer inoxidable AISI 316L, i tot i no oferir tan bones propietats mecàniques ni tanta biocompatibilitat com el titani, resulta més econòmic i a vegades suficient per a l'aplicació.

Un cas a part són les **pròtesis ortopèdiques**, que el que fan és substituir una articulació. Les de genoll i de maluc són les més usades actualment, encara que també n'existeixen d'espalla, colze, turmell o canell. Històricament per a la fabricació de les pròtesis s'usava l'acer inoxidable, cosa que encara avui dia es fa, i es fixava a l'os mitjançant un ciment ossi consistent en polimetil metacrilat. També existeixen

al mercat pròtesis de Cr-Co-Mo, el qual presenta una excel·lent resistència a la corrosió; però sembla que és l'aliatge Ti6Al4V el que ofereix un millor potencial degut a les seves bones característiques mecàniques, la seva resistència a la corrosió, la seva baixa densitat i la seva excel·lent biocompatibilitat.

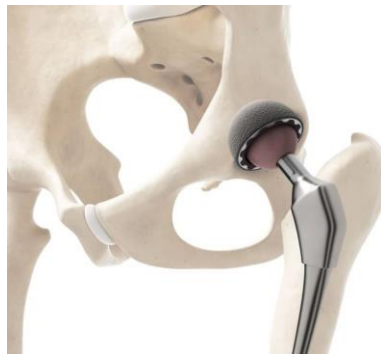


Figura 1: Pròtesis total de maluc

Els implants dentals s'usen cada cop més àmpliament i se'n distingeixen dos tipus: els que donen suport a la dentadura i els que substitueixen la dent en si. Aquests implants han de tenir una excel·lent biocompatibilitat, resistència a la corrosió, alta resistència compressiva i tenacitat, i una fixació viable entre l'os alveolar i el teixit mucós. Tots aquests requeriments fan que el titani sigui àmpliament usat en implants dentals [16].

### 2.1.3. Limitacions del titani en el camp mèdic

Tot i les bones característiques del titani en quant a les aplicacions mèdiques, aquest metall té també certes limitacions que fan que es requereixi de recerca contínua per trobar possibles millores que el facin superar-les.

La primera d'aquestes limitacions és la integració. Com s'ha dit prèviament, el titani resulta perfectament biocompatible amb els teixits perquè no en reacciona. Però el fet de no reaccionar, en el cas de la osteointegració, per exemple, resulta perjudicial. Al no tenir "bio-relació" amb el teixit, el titani pot causar que es creï algun tipus de moviment entre la pròtesis i el mateix teixit.

Degut a això, actualment es treballa activament en el camp de la bioactivació de la superfície del titani, mitjançant l'ús de pèptids per exemple, o en tècniques de canvi superficial per millorar la osteointegració, com crear porus al titani i impulsar-ne la creació d'os dins d'ells.

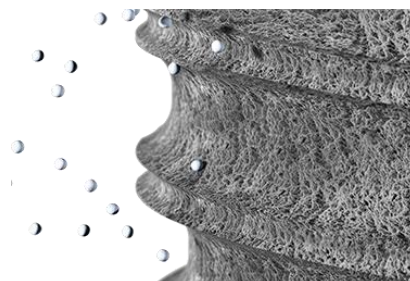


Figura 2: Osteointegració os-titani amb porus a la superfície del biomaterial per anclar l'os

Una altra de les limitacions del titani en el camp mèdic és la seva diferència del seu mòdul d'elasticitat vers el de l'os. El mòdul d'elasticitat o mòdul de Young és la relació que existeix entre una tensió aplicada al material i la deformació que experimenta degut a aquesta; i el mòdul de Young del titani (Taula1) és molt més gran que el de l'os. Aquesta diferència pot causar a la llarga un apantallament de tensions amb conseqüències negatives sobre el teixit.

## 2.2. Tractaments superficials al titani

La majoria dels implants fallen perquè es perd la interfície entre l'implant i el teixit, suggerint una deficiència d'integració que contribueix a la seva fallida [17]. Així, la relació implant-teixit (en relació a implants ossis) és de gran importància ja que d'ella depèn la integració entre el dispositiu i l'os i així també, la possibilitat d'aparició d'infeccions. Una de les solucions presentades al món científic avui dia és el tractament superficial dels implants per tal d'adequar-ne el creixement cel·lular i el no-creixement bacterià.

Són les propietats químiques, físiques i la topografia de la superfície de l'implant les que fomentaran o no el creixement de l'os al voltant d'ell; i l'aparició i colonització de bacteris a la seva superfície. Estudis recents han demostrat que aquest procés està influenciat per a geometria i la topografia de la superfície [18], [19], [20]. La modificació de la rugositat i de l'àrea superficial poden proporcionar un medi més adequat per a l'adsorció de proteïnes i el creixement cel·lular, accelerant el procés de regeneració de l'os i millorant a curt i llarg termini la osteointegració dels implants [21]. Per tant, la superfície dels implants necessita d'un tractament superficial per optimitzar les seves propietats i millorar la seva biocompatibilitat. Degut a que el titani és àmpliament usat en implants degut a les seves característiques, entre les quals destaquen biocompatibilitat i resistència a la corrosió, actualment s'estudien tècniques de modificació de la superfície del titani per a millora de la integració i per a creació d'efectes antibacterians.

Existeixen una gran varietat de tècniques de tractament superficial i es classifiquen segons la rugositat creada, és a dir, es diferenciarien en els grups macro, micro o nanomètric, classificació dins la qual existeixen més sub-classificacions.

La importància d'una topografia a escala micromètrica va ser remarcada per Li, et al. 2002 [22], on es va documentar un ràpid creixement ossi i gran contacte entre os i implant a partir d'un sorrejat i un atac àcid. Algunes de les tècniques de modificació de la topografia superficial són les següents [23]:

- **Projecció tèrmica:** Es pot definir com l'aportació de materials projectats en forma de partícules foses finament dividides sobre un substrat degudament preparat. L'espessor de la capa

formada ha de ser d'entre 30 i 50  $\mu\text{m}$  per ser uniforme, arribant així a uns valors de rugositat de 7  $\mu\text{m}$ .

- Sorrejat: Consisteix en projectar partícules abrasives, a alta pressió, sobre la superfície de l'implant, generant una rugositat del rang de 10  $\mu\text{m}$ . Exemples de partícules usades en aquesta tècnica són l'alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), titania ( $\text{TiO}_2$ ) o hidroxiapatita.
- Tractament àcid: Es tracta d'atacar els implants químicament per àcids forts durant períodes curts de temps i a temperatures inferiors als 100°C.
- Oxidació electroquímica: Es tracta d'un tractament electroquímic aplicat a la capa d'òxid de la superfície de l'implant. Es realitza a través d'una reacció oxidació-reducció.
- Tractaments bioactius: s'han desenvolupat recobriments amb materials bioactius, com la hidroxiapatita o el fosfat de calci per millorar la biocompatibilitat.

### 2.2.1. Efecte antibacterià

A l'hora de tractar superfícies antibacterianes, cal diferenciar entre superfícies **antibiòtiques** i superfícies **bactericides**. Les superfícies antibacterianes poden repel·lir o poden resistir la fixació de bacteris ja sigui denotant un efecte antibiòtic, degut a la presència d'una química o d'una topografia de superfície desfavorable; o bé inactivant qualsevol bacteri que hi tingui contacte, causant la mort de la cèl·lula, així denotant un efecte bactericida [24].

Els tractaments superficials existents avui dia, tot i l'esmentat a l'apartat anterior, no solament estan centrats en promoure la integració implant-os, sinó que també cal tenir en compte el seu efecte antibacterià. De totes formes, el paper que la topografia micro i nanomètrica a la superfície juga respecte el control de fixació de bacteris avui dia encara no s'ha consolidat [10].

### 2.2.2. Complexitats amb el disseny experimental

Es creu que els bacteris responen segons el seu confinament espacial i segons els senyals ambientals externs, però de totes formes la naturalesa, l'extensió i l'escala de la seva resposta són avui dia una assignatura pendent.

Les interaccions bacterianes amb superfícies metàl·liques són un boníssim exemple de la falta de consens quant a si es pot correlacionar definitivament l'augment de la rugositat de la superfície amb la fixació bacteriana, tot i el gran nombre d'investigacions dutes a terme en les últimes dècades [25].

Passa que moltes superfícies que presenten una topografia característica, tenen, a part, una energia química i una energia superficial que poden retardar o fomentar determinats comportaments dels bacteris. És a dir, encara que existeixin estudis de superfícies que, per alguna propietat topogràfica o química, tenen la capacitat d'usar-se per obtenir perfils d'adherència; l'elecció del material substrat o

la de l'espècie de bacteri usat, limita l'abast comparatiu de l'assaig dut a terme. A més a més, deixant de banda les conclusions extreïtes d'un assaig, cal tenir en compte que les superfícies patentades sovint són modificades pel que fa a la seva funcionalitat química superficial, amb l'objectiu d'optimitzar el seu ús per a l'aplicació desitjada [25].

Paral·lelament, hi ha estudis que han demostrat diferents comportaments bacterians segons la soca. Per exemple, Whitehead, et al. 2006 [26] va arribar a la conclusió al seu assaig que la soca grampositiva *S. Aureus* s'adheria més a superfícies on la rugositat mitja  $R_A$  era de 8,7 nm i menys a aquelles caracteritzades per una  $R_A$  de 43,6 nm. Mentre que la soca gramnegativa *P. aeruginosa* ho feia a l'inrevés.

També hi ha estudis que han demostrat adherència i creixement modificats de bacteris segons el material triat com a substrat. Oh, et al. 2009 [27], per exemple, van registrar diferències en la forma del biofilm format per *P. aeruginosa* degut al material substrat.

## 2.3. Abast del treball

Mitjançant un atac de caràcter àcid, la superfície del titani queda modificada creant una nanoestructura que segons l'article *Surface Nanoporosity has a greater influence on osteogenic and bacterial cell adhesion than crystallinity and wettability* [1] esdevé antibacteriana. Així doncs, l'objectiu del projecte és replicar aquesta superfície que per si sola és antibacteriana i a més a més, tal com diu l'altre article *Anhydride-functional silane immobilized onto titanium surfaces induces osteoblasts cell differentiation and reduces bacterial adhesion and biofilm formation* [2], afegir un silà anomenat TESPSA que també té un efecte antibacterià; de forma que amb la combinació d'ambdós efectes, poder obtenir una superfície del titani idònia, pel seu caràcter antibacterià, pels implants dentals.

Com a objectiu extra del projecte, s'intenta, també, optimitzar el temps de producció de la superfície de titani creada segons el primer dels articles [1].

### 3. MARC EXPERIMENTAL

#### 3.1. Materials i Metodologia

##### 3.1.1. Preparació de les mostres

Per a poder dur a terme els assajos del projecte, va caler preparar discs de titani polits fins a un acabat de mirall, que d'un inici es disposa sense polir. Es tracta de discs de titani de 12 mm de diàmetre i un gruix variable entre 2 i 3 mm, que han de passar per diverses etapes de preparació per a poder ser usats.

##### 3.1.1.1. Embaquelitar

Per poder polir correctament i còmoda els discos, abans és necessari que es disposin en grups i de forma compacta mitjançant baquelita, un plàstic sintetitzat a partir de molècules de fenol i formaldehid, que sovint es té en forma de pols i esdevé dur en solidificar [28]. Usant la màquina *LaboPress 3* de *Struers*, és possible disposar els discos de cinc en cinc.



Figura 3: Embaquelitadora LaboPress 3 de Struers

##### 3.1.1.2. Polir

Els cilindres de baquelita amb els discs han de ser introduïts a la plataforma de la polidora automàtica *Rotapol 3*, també de *Struers*. Posteriorment, s'ha de procedir a diversos cicles amb diferents papers de polir, reduint-se així la mida de gra del paper a mesura que s'avança amb el polit.

La polidora conté un braç giratori, on hi ha un disc amb sis forats on es dispositen els cilindres de baquelita amb els discs de titani. També conte un disc rotatori on es col·loca el paper de polir, i un sortidor d'aigua per a refrigerar i millorar el fregament de les mostres amb el paper. Per últim té un panell de control mitjançant el qual s'escullen els paràmetres que modificaran el programa de polit.



Figura 4: Polidora RotoPol 3 de Struers

El protocol seguit per a polir els discs de titani, és a dir els paràmetres escollits, fins a un acabat mirall va ser el següent:

PAS	PAPER	FORÇA	RPM	TEMPS	DIRECCIÓ	FRICCIÓ	REPETICIONS
1	P600	5 N	150	5 minuts	×	H <sub>2</sub> O	1
2	P1200	10 N	150	5 minuts	×	H <sub>2</sub> O	3
3	P2500	10 N	150	3 minuts	×	H <sub>2</sub> O	3
4	Vellut (SiO <sub>2</sub> )	10 N	150	15 minuts	×	Sílica	2

Taula 2: Protocol de poliment de mostres de titani embaquelitades

Durant el procés de polit poden aparèixer alguns inconvenients que obstaculitzen el procés, com per exemple l'aparició de plans degut a la no-uniformitat de l'aplicació de força dels pistons a les mostres o la formació de cristalls de sílica en els últims passos del procés.

### 3.1.1.3. Desembaquelitar

Un cop els discs estan polits, cal treure'ls de la baquelita, i això es pot fer amb una premsa hidràulica. Posant el cilindre de baquelita dins d'un drap i aplicant-li una força perpendicular amb la premsa, la baquelita es trenca i surten els discs.



De totes formes, cal anar molt en compte amb aquest procés ja que hi ha un alt risc de ratllar les mostres si surten disparades i no són parades pel drap o si els mateixos discs es ratllen entre ells.

#### 3.1.1.4. Netejar

Per treure totes les impureses que puguin haver als discos polits, cal seguir un protocol de neteja.

En primer lloc, després de treure els discos de la baquelita, s'han de disposar cap per amunt i sense solapaments entre ells en un vas de precipitats amb acetona, i introduir el vas dins d'un bany ultrasònic durant cinc minuts. Després de l'acetona, cal netejar amb ciclohexà; tres banys al sonicador de cinc minuts cada un, cosa que servirà per treure totes les restes de matèria orgànica que hi hagi a la superfície. Després d'un altre bany d'un minut en acetona, calen tres rentats de cinc minuts cada un d'aigua destil·lada, tres d'etanol i tres últims en acetona.



Figura 5: Bany d'ultrasons de les mostres

Per finalitzar la neteja, sense retirar l'acetona de l'últim bany, cal assecar les mostres una a una amb  $N_2$  i guardar-les a una placa de pous.

#### 3.1.2. Atac a les mostres

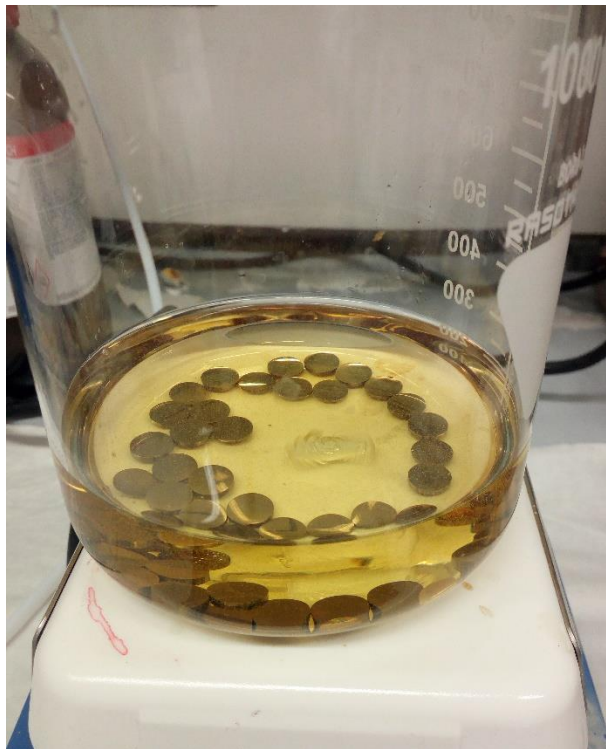
Un dels objectius d'aquest projecte recau en el fet de replicar la superfície del titani de l'article de Rodriguez-Contreras, et al. 2018, [1] i per això cal atacar, com diu l'article, les mostres amb una solució àcida que rep el nom de *Piranha*. Es tracta d'una dissolució 50:50 d'àcid sulfúric 96% i peròxid d'hidrogen 30%.

Per a preparar aquesta dissolució cal tenir molts factors en compte, ja que la mescla de l'àcid sulfúric i el peròxid d'hidrogen és molt exotèrmica, de forma que cal dur-la a terme a temperatura controlada,

en gel, i mesclant les dues substàncies molt lentament. També tenir en compte la perillositat de treballar amb àcid sulfúric, de forma que cal prendre les mesures de seguretat adequades.

Un cop la dissolució està preparada i a temperatura ambient, cal introduir les mostres de titani cap per amunt al vas de precipitats on es tingui preparada aquesta i posar-lo a un agitador, ja que l'atac ha de dur-se a terme amb moviment de la dissolució sobre les mostres.

A l'article del qual es vol imitar la superfície, es duu a terme un únic atac de 90 minuts a les mostres de titani i es compara amb les mostres no atacades (o atacades 0 minuts), però per contra, al projecte descrit en aquest document, l'atac no es va produir a totes les mostres per igual, sinó que es van diferenciar quatre classes de mostres atacades segons el temps d'exposició a la solució Piranha. Així doncs, es van establir quatre durades de temps d'exposició: 0 minuts (control), 30 minuts, 60 minuts i 90 minuts.



*Figura 6: Atac amb solució Piranha a les mostres*

Un cop passats els minuts corresponents per a cada mostra, es van treure i es van netejar cinc cops en aigua destil·lada i es va fer un bany ultrasònic d'aigua de 15 minuts. Finalment es van assecar en  $N_2$ .

De totes les mostres resultants, agrupades en quatre grups diferents segons la seva classe, es va fer un estudi per caracteritzar la seva superfície i observar l'adhesió de bacteris.

### 3.1.3. Caracterització de la superfície

A l'hora de treballar amb una superfície modificada, cal caracteritzar la seva superfície, és a dir, mitjançant diverses tècniques, trobar quines propietats té o ha desenvolupat aquesta superfície. Aquestes tècniques són moltes i permeten determinar tot tipus de propietats com per exemple la composició química, la rugositat, l'estructura atòmica superficial, transmissió, hidrofília, etc.

Per a la caracterització de la superfície treballada en aquest projecte, s'ha fet l'estudi de la seva rugositat i de la seva hidrofília.

#### 3.1.3.1. Interferometria Òptica

L'interferòmetre és un instrument òptic que usa la interferència d'ones lumíniques per a mesurar amb gran precisió longituds d'ona de la mateixa llum. Es fan servir dos feixos de llum que recorren trajectòries òptiques diferents, determinades per un sistema generalment de miralls i prismes que, finalment, convergeixen per a formar un patró de interferència [29], [30].

Per fer-ho s'ha usat el Wyko NT9300 de Veeco i s'han pogut extreure dades sobre la rugositat superficial de les mostres atacades.



Figura 7: Interferòmetre òptic Wyko NT9300 de Veeco

Les mesures de rugositat que s'han obtingut mitjançant l'interferòmetre òptic són  $R_a$  i  $R_z$ . Tots dos són paràmetres de la rugositat superficial i es poden obtenir de la mateixa presa de mesura.

La  $R_a$  o rugositat mitja aritmètica està definida com la mitja aritmètica dels valors absoluts de les coordenades dels punts del perfil de rugositat en relació a la línia mitja dins del perfil de mesura [31].

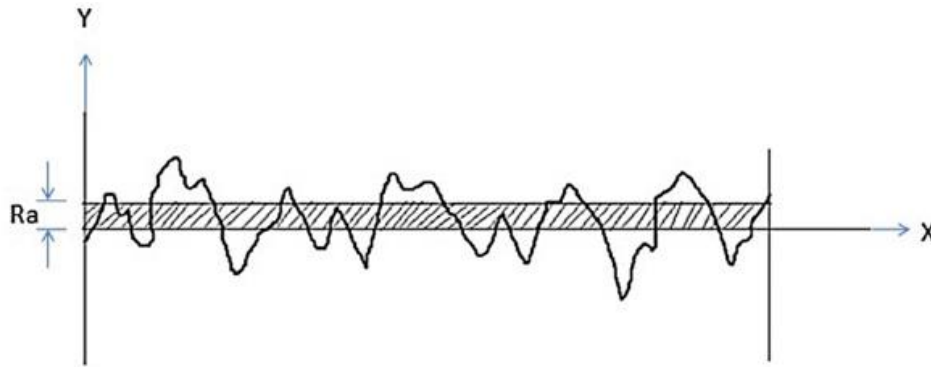


Figura 8: Representació de la rugositat mitja

Per altra banda, la  $R_z$  o rugositat parcial és igual a la suma de les ordenades, en valor absolut, dels punts més allunyats de la línia mitja, és a dir, la distància entre els punts màxim i mínim del perfil de mesura [31].

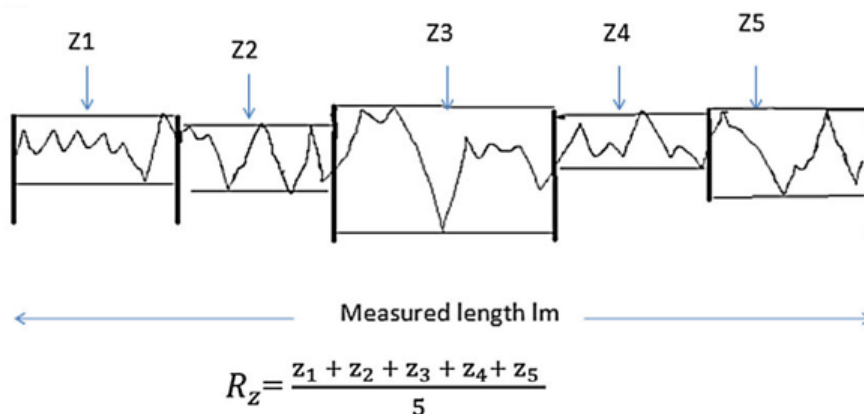


Figura 9: Representació de la rugositat parcial

### 3.1.3.2. Angle de contacte

L'altre paràmetre estudiat en l'assaig va ser la hidrofília o hidrofòbia de la superfície de les mostres de titani.

De forma general, es defineix l'angle de contacte com l'angle que forma la superfície d'un líquid a l'entrar en contacte amb una superfície sòlida. El valor de l'angle de contacte depèn principalment de la relació existent entre les forces adhesives del líquid i del sòlid i les forces cohesives del propi líquid [32].

D'aquesta forma, l'angle de contacte esdevé una de les tècniques per determinar la hidrofília de la superfície d'una mostra calculant l'angle que forma una gota d'aigua en aquesta superfície.

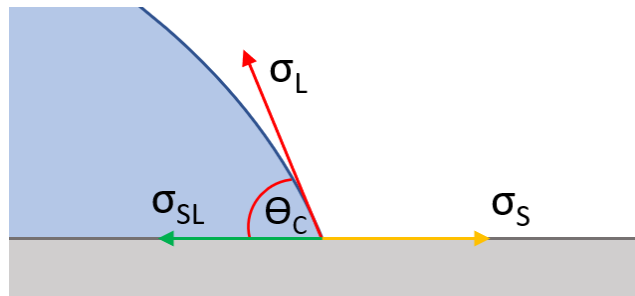


Figura 10: Representació de l'angle de contacte d'una gota d'aigua en una superfície sòlida

Mitjançant l'equació de Young es pot calcular aquest angle de contacte entre la superfície i el líquid [33]:

$$\sigma_L \cdot \cos \theta_c = \sigma_S - \sigma_{SL}$$

Si l'angle  $\theta_c$  és inferior a  $90^\circ$  es considera una superfície hidrofílica, i per contra, si l'angle  $\theta_c$  n'és superior, es considerarà una superfície hidrofòbica.

Es tracta d'una tècnica de caracterització de la superfície dels materials indispensable a l'hora de tractar amb biomaterials, ja l'aigua estarà present en molts fluids amb els quals entrarà en contacte un cop implantat a l'organisme, com ara la sang.

Per aquest assaig s'ha usat un tensiòmetre, model OCA de Dataphysics que conté un detector òptic de Telstar.

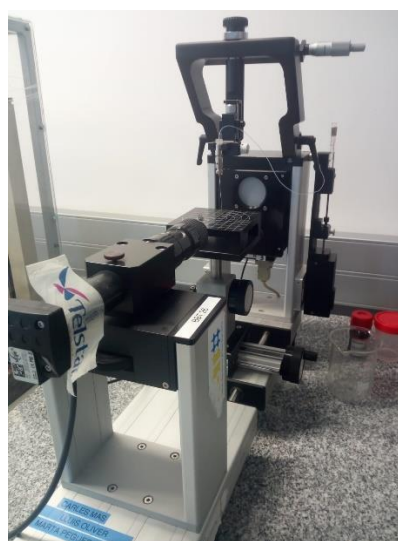


Figura 11: Tensiòmetre model OCA de Dataphysics.

### 3.1.4. Silanització

Per a dur a terme la part final del projecte, cal afegir el silà TESPSA (triethoxysilylpropyl succinic anhydride) a algunes de les mostres. Cal dir que aquest procés no s'ha dut a terme al llarg de tots els assajos, ja que per als primers només es va estudiar l'efectivitat antibacteriana del tractament superficial amb *Piranha*.

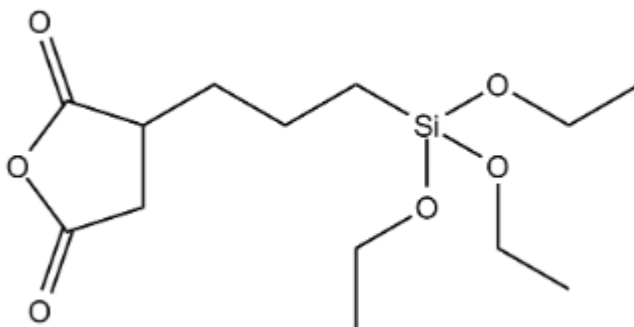


Figura 12: Estructura del triethoxysilylpropyl succinic anhydride.

La silanització consisteix en una reacció química entre un silà funcional i grups hidroxil (-OH) que es troben a la superfície del titani. És per això que cal activar la superfície del titani (fer que tinguin grups hidroxil a la superfície) mitjançant plasma, i posteriorment es durà a terme la pròpia silanització.

#### 3.1.4.1. Activació amb plasma

Com s'ha dit prèviament, la silanització és la reacció entre un silà i els grups hidroxil de la superfície de les mostres. Per a tenir aquests grups hidroxils, s'ha procedit a una activació amb plasma de les mostres, que fa precisament això.

L'activació amb plasma pot millorar les propietats d'adhesió de superfícies no reactives, i molts materials solament podran recobrir-se després d'haver estat sotmesos a alguna forma d'activació. El tractament d'activació superficial amb plasma és summament ràpid i efectiu [34].

Per aquest projecte s'ha fet mitjançant l'equip Electronic Diener Femto (Plasma Surface Technology) amb activació mitjançant oxigen.



Figura 13: Electronic Diener Femto (Plasma Surface Technology)

### 3.1.4.2. Silanització

Les mostres es van submergir en una solució 0,5% de TESPSA en toluè anhidre, a la qual també se li va afegir una solució 3% de N,N-diisopropiletilamina (DIEA) per a mantenir un medi bàsic. Aquesta silanització es va dur a terme en atmosfera de nitrogen, a 70°C i en agitació, durant una hora. Un cop tractades, les mostres es van dipositar en un vas de precipitats amb toluè i es van sotmetre a un bany ultrasònic durant 10 minuts. Posteriorment, es van dur a terme tres banys en isopropanol, tres amb etanol, tres amb aigua destil·lada i tres amb acetona. Finalment, es van assecar amb nitrogen [2].

### 3.1.5. Assajos amb bacteris

Amb l'objectiu de dur a terme un estudi de l'efectivitat del mètode en quant a adhesió de bacteris a la superfície dels implants dentals de superfície modificada, es van fer diversos assajos.

Per a fer els assajos es va seguir el mateix protocol en tots ells, amb algunes modificacions entre alguns.

Cal dir que al tractar-se d'assajos amb bacteris, és un punt clau en qualsevol protocol que cap solució que s'hagi d'analitzar o usar quedi contaminada amb bacteris que no siguin els de l'estudi. És per això que pràcticament tot l'assaig s'ha de dur a terme dins una cabina de flux laminar. Es tracta d'un recinte que usa un ventilador per forçar el pas d'aire a través d'un filtre i proporciona aire net a la zona de treball, de forma que aquesta queda neta i estèril.

#### 3.1.5.1. Preparació prèvia d'elements necessaris

Durant el propi assaig de bacteris va caldre usar una sèrie d'elements que s'haurien preparat el dia o els dies anteriors a l'assaig, pel fet de facilitar la rapidesa durant l'assaig.

En primer lloc, serien necessàries tres dissolucions per a fer l'assaig. La primera d'elles és el medi de cultiu dels bacteris, una solució que conté els nutrients necessaris per permetre, en condicions favorables de PH i temperatura, el creixement de microorganismes. Per a preparar-lo, com que normalment trobem el medi de cultiu en pols, simplement cal diluir-lo en la quantitat d'aigua destil·lada que es desitgi i un cop dissolt, cal esterilitzar la solució mitjançant l'autoclau. El fabricant del medi ha d'indicar la quantitat de medi per volum d'aigua que cal posar per a la seva creació. En el cas de la preparació de medi per aquest projecte s'ha usat BHI (Brain Heart Infusion, de la marca Scharlau 18,5 g/L).

Per a cultivar els bacteris, calen plaques de petri amb el medi de cultiu corresponent, anomenades així, plaques d'agar. Es tracta d'una solució resultant de la mescla d'aigua destil·lada, el mateix medi de cultiu usat prèviament (BHI en aquest cas) i agarosa. L'agarosa és un polisacàrid inert i no tòxic que el que farà és donar-li una consistència gelatinosa al nostre medi de cultiu per a poder crear aquestes plaques. Es crea de la mateixa forma que es crea el medi de cultiu però afegint una quantitat, també determinada pel fabricant, d'agarosa. Per a aquest projecte s'ha usat l'agarosa de la marca Scharlau (7,5 g/L). Al finalitzar la dissolució, caldrà esterilitzar-la també, però tenint en compte que als 40°C, un cop hagi finalitzat el cicle d'esterilització, aproximadament, el medi solidificarà degut a la presència d'agarosa. Això implica, que amb la solució a uns 50-60°C, caldrà posar-la a les plaques de petri buides i deixar que solidifiqui en elles.



*Figura 14: Plaques de petri amb agar*

Un cop el medi de cultiu hagi solidificat a les plaques, cal guardar-les dins d'algun element tancat per a que no entri cap bacteri, i posar-les al refrigerador per a usar-les posteriorment.

Per altra banda, el PBS i el PB són dos tampons fosfats que s'han de preparar també prèviament a l'assaig ja que seran necessaris durant el procés.

L'ús de totes les substàncies acabades d'explicar, es troba en els apartats posteriors, on es detalla el procés sencer de l'assaig.

### **3.1.5.2. Dia previ a l'assaig**

24 hores abans de cada assaig, es va preparar la dissolució de bacteris que s'usaria en tal assaig, deixant-los reposar a 37° C per tal de tenir una població plena de bacteris.

Per a fer-ho, cal tenir una soca de bacteris preparada i guardada en refrigeració d'on se n'extrauran algunes colònies mitjançant una nansa esterilitzada i es dipositaran a un tub falcon amb 10 mL de medi de cultiu. Un cop es dissolguin les colònies agafades fins que no es puguin percebre a simple vista dins del medi, es guardarà el tub dins de la incubadora a 37°C fins al dia següent.



### 3.1.5.3. Assaig de bacteris

Al dia de l'assaig, es va preparar una solució de bacteris de densitat òptica 0,2, procedent del tub preparat el dia anterior, ja que això implica una quantitat de  $10^8$  bacteris per cada mil·lilitre, cosa que facilita el seu comptatge.

Les mostres es van dipositar en una placa de 48 pous i després de ser esterilitzades amb etanol, es van fer tres rentats amb PBS (tampó fosfat salí, conegut per les seves sigles en anglès (*phosphate buffered saline*) a cada una d'elles. Posteriorment, es van submergir les mostres en la solució de bacteris prèviament preparada i es van deixar reposar durant 2 hores a  $37^\circ\text{C}$ .

Es van fer servir dos mètodes de comptatge de bacteris diferents, que comencen a diferir a partir d'aquest punt.

### 3.1.5.4. Comptatge amb plaques de petri

Un cop passades les dues hores, es va retirar la solució restant que envoltava les mostres de titani i es van fer tres rentats amb PBS per a cada una d'elles de nou, amb l'objectiu d'eliminar tots els bacteris que no s'haguessin enganxat a la superfície del titani. Es va afegir 1 mil·lilitre de PBS a cada pou de la placa i es va sotmetre la placa, amb les mostres i el mil·lilitre de PBS per mostra, a un bany d'ultrasons de forma que els bacteris que sí havien quedat enganxats a la superfície, quedessin surant al mil·lilitre de PBS.

Un cop es va obtenir aquest mil·lilitre amb els bacteris prèviament enganxats al titani, es van dur a terme 4 dilucions 1:10 en PBS, de forma que posteriorment es poguessin comptar fàcilment aquests bacteris. Les dilucions 2, 3 i 4 es van cultivar sobre d'unes plaques de petri prèviament preparades, de la següent forma:

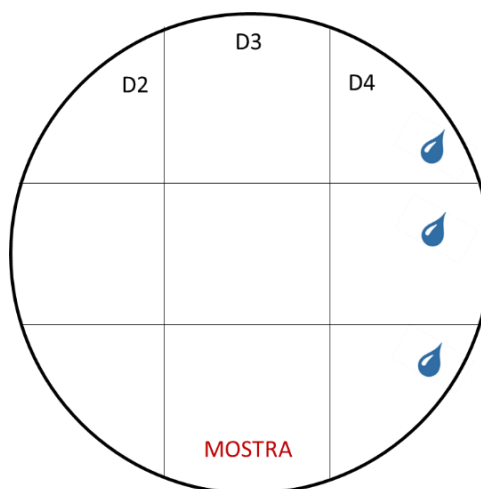


Figura 15: Representació de la distribució del cultiu dels bacteris a la placa de petri

Com es pot veure a la imatge, es van cultivar les tres últimes dilucions (2, 3 i 4) i de cada una d'elles, tres gotes diferents de 5 µL de cada d'elles, per poder calcular la mitjana aritmètica per triplicat i així minimitzar l'error.

Un cop finalitzades les plaques, es van deixar reposar 24 hores a la incubadora a 37°C per deixar que de cada bacteri creés una colònia. Passades aquestes 24 hores, es van poder comptar les colònies de bacteris, cosa que permet obtenir una relació proporcional al nombre de bacteris enganxats a la superfície del titani de cada mostra.

### 3.1.5.5. Comptatge amb imatge de SEM

L'altra manera de comptar que s'ha usat per aquest projecte consisteix en adherir els bacteris que han quedat a la superfície per a poder-los observar posteriorment mitjançant el SEM (*Scanning Electron Microscope*).

Un cop passades les dues hores de les mostres amb la solució de bacteris, es va retirar la solució restant que envoltava les mostres de titani i es van fer tres rentats amb PB per a cada una d'elles. Tot seguit, es van submergir les mostres en una solució de Gluteraldehid al 2,5% en PB i es van deixar 1 hora a 4°C. Aquesta solució fixa els bacteris que hi ha a la superfície del titani, de forma que amb rentats futurs, aquests no desapareguin.

Un cop passada aquesta hora, es tornaren a rentar les mostres amb PB i, submergides en aquesta mateixa solució, es van poder guardar en fred fins a la deshidratació.

La deshidratació és un procés que serveix per a treure totes les restes d'aigua que poden quedar a la mostra, amb l'objectiu de procedir correctament a la visualització de la superfície de les mostres amb al SEM. Aquest procés consta en submergir les mostres en dissolucions d'etanol amb aigua (començant amb una dissolució del 50% d'etanol fins arribar a una del 100%) i finalment en hexametildisilazà (HMDS) per acabar de deshidratar del tot.

Amb les mostres deshidratades, es va poder observar al SEM la superfície de les mostres de titani amb els bacteris adherits a ella, de forma que el nombre de bacteris es van poder quantificar.

De totes formes, aquest mètode de comptatge no resulta tan fiable com l'explicat anteriorment, degut al fet que la disposició de bacteris sobre la mostra no serà uniforme, i la quantificació de bacteris variarà segons la zona observada amb el microscopi.

### **3.1.6. Càlculs estadístics**

A partir dels valors experimentals extrets de les mostres, s'ha usat el programa Excel per a representar aquests valors i les seves dades estadístiques.

En la major part dels assajos del projecte s'ha treballat amb mostres triplicades, és a dir, tres mostres de cada condició estudiada. A part, de les dades obtingudes per a la caracterització de la superfície, s'ha estudiat diverses zones de cada una de les mostres. De tots els valors obtinguts s'ha usat la comanda *Promedio* del programa per a calcular la mitjana aritmètica, i la comanda *Desvest* per a calcular la desviació estàndard.



## 4. RESULTATS

Aquest projecte es divideix en dues etapes diferents segons el tipus de mostres que s'han extret de l'atac. La primera etapa és aquella en que es vol assolir el primer dels objectius del projecte: una imitació de la superfície antibacteriana del titani de l'article de Rodríguez-Contreras, et al. 2018.

La segona etapa del projecte sorgeix de la dependència dels resultats de la primera, i és que de la primera etapa, s'escull la superfície de titani que més resultats antibacterians hagi assolit, i amb aquesta, es procedeix a estudiar l'efecte del silà TESPAS en aquesta superfície.

### 4.1. Primera Etapa

En aquesta primera etapa es proposen els diferents temps d'exposició a l'atac amb *Piranha*, per veure si és possible optimitzar temporalment el procés i finalment es duu a terme una caracterització de la superfície i uns assajos amb bacteris.

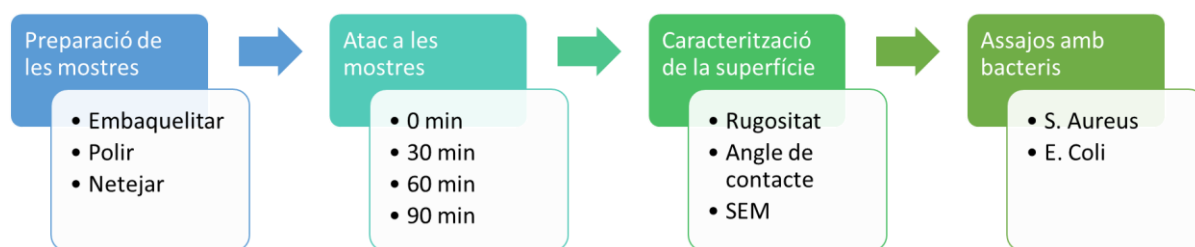
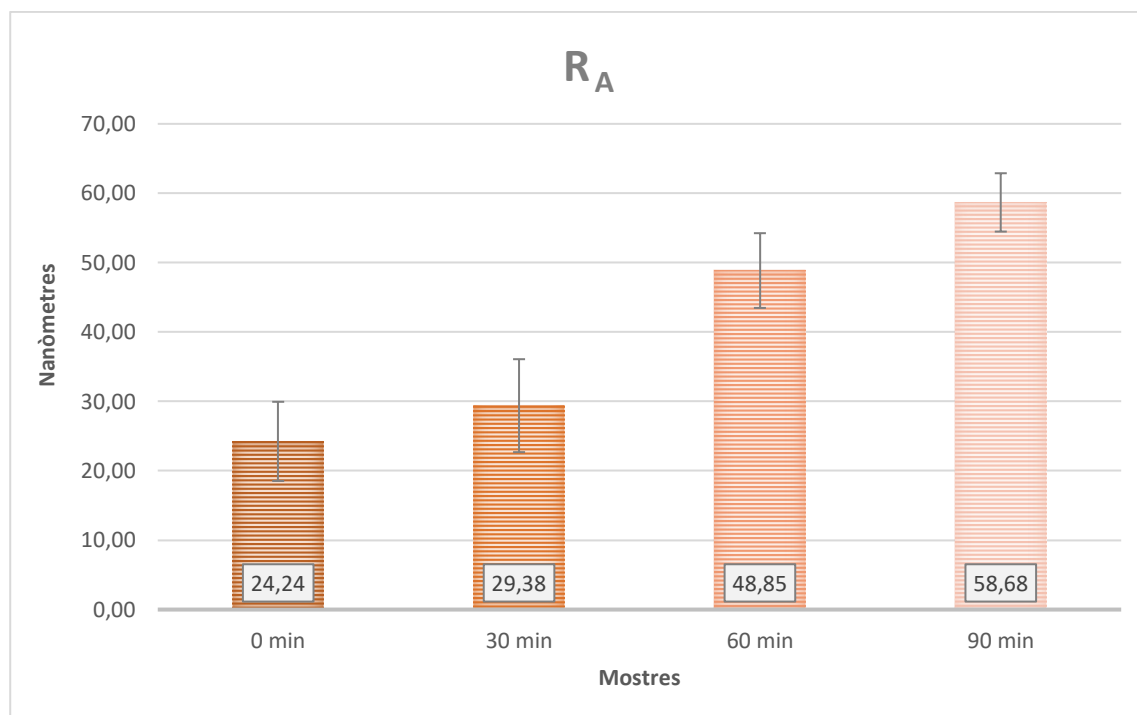


Figura 16: Representació de les activitats de la primera etapa del projecte.

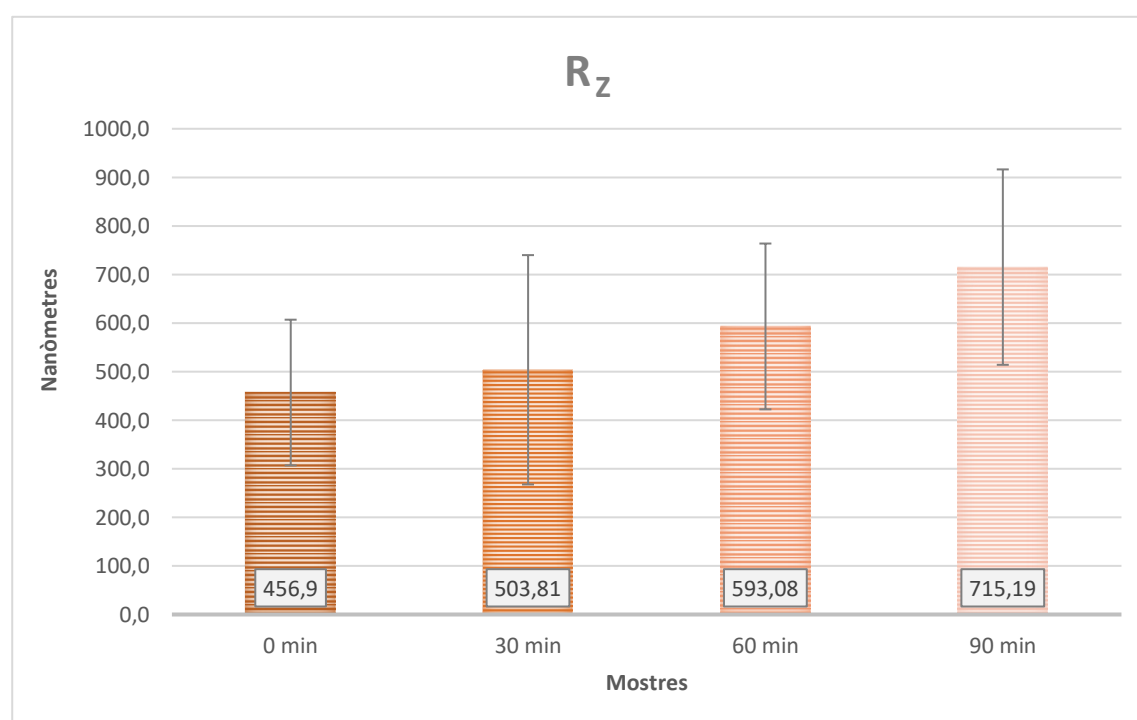
#### 4.1.1. Caracterització de la superfície

##### 4.1.1.1. Rugositat

Mitjançant la interferometria òptica s'han calculat la rugositat mitja aritmètica ( $R_A$ ) i la rugositat parcial ( $R_z$ ) dels diferents tipus de mostres. Cada condició fou triplicada, de forma que s'han obtingut resultats de tres mostres per cada temps d'exposició a l'atac; i de cada mostra se n'ha analitzat cinc zones diferents. Així doncs, de les 15 dades disponibles se n'ha fet la mitjana aritmètica i se n'ha calculat l'error mitjançant la desviació estàndard.



Gràfica 1: Rugositat mitja expressada en nanòmetres de les mostres de 0, 30, 60 i 90 minuts d'atac.



Gràfica 2: Rugositat parcial expressada en nanòmetres de les mostres de 0, 30, 60 i 90 minuts d'atac.

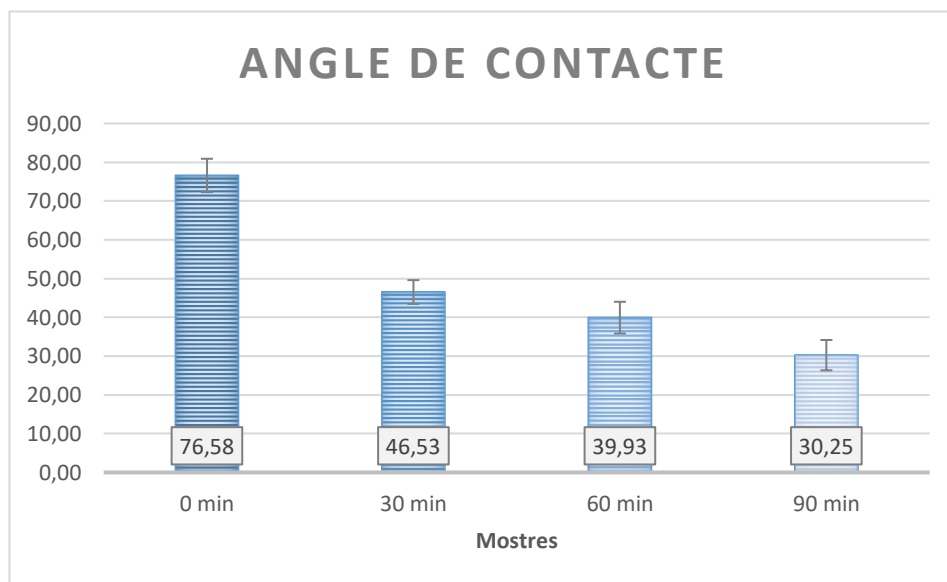
A ambdues gràfiques es pot observar la tendència ascendent en quant a rugositat, ja que a més temps d'exposició a la solució àcida, més modificada resulta la superfície del titani, tal com s'esperava. Per

altra banda, els valors numèrics d'aquesta rugositat no corresponen als valors presentats a l'article de Rodríguez-Contreras, et al. 2018 [1], on presenten un valor de  $R_A$  mig de 13,3 nm i un valor de  $R_z$  mig de 79,4 nm per la mostra de 90 minuts d'atac. Aquest fet difereix molt dels valors trobats amb la presa de dades del projecte:  $R_A$  de 58,68 nm i  $R_z$  de 715,19 nm. Aquest últim valor ( $R_z=715,19$  nm) no resulta del tot fiable degut al seu alt error, tal com es mostra amb una línia al gràfic, que com es pot veure, fa que els resultats no siguin estadísticament diferents i no es pugui concloure quelcom amb absoluta certesa. Però el valor de  $R_A$  queda menys qüestionat, ja que l'error resulta més baix, tot i que hi ha parells de dades que no són estadísticament diferents (0-30 i 60-90). De totes formes, aquest resultat es podria recolzar en la possibilitat de que degut a un acabat de polit no plenament llis, els valors de la rugositat quedessin lleugerament modificats.

També cal tenir en compte el fet de que a l'assaig de l'article base, la rugositat es mesura amb un microscopi de força atòmica (AFM) i per a aquest projecte s'ha usat un interferòmetre òptic, cosa que pot portar a error.

#### 4.1.1.2. Angle de contacte

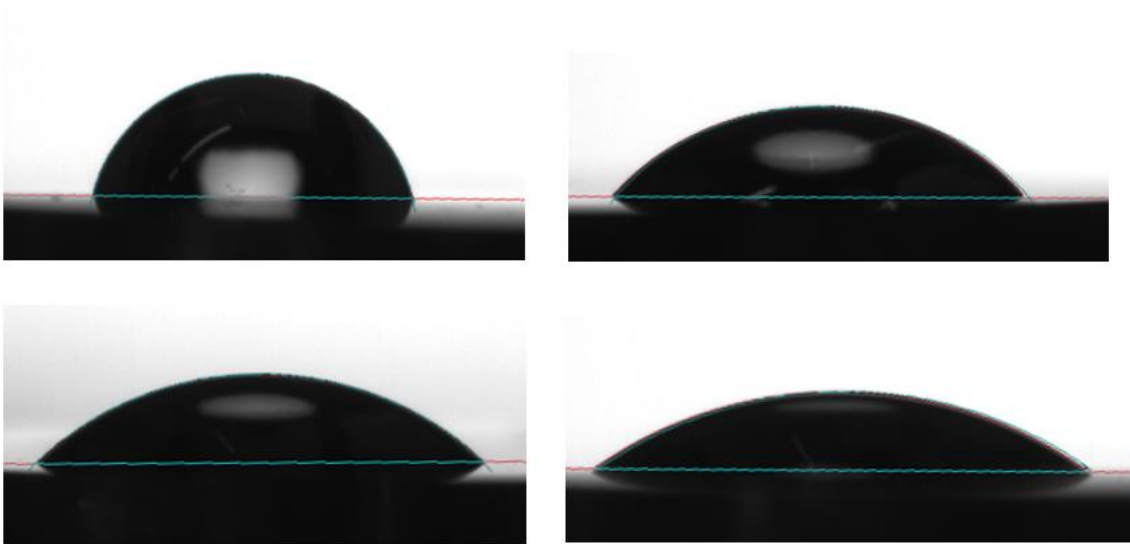
S'ha calculat l'angle de contacte de 4 gotes per mostra i es disposa de tres mostres per condició, de forma que s'ha fet la mitjana aritmètica dels 12 valors. També s'ha calculat l'error, mitjançant la desviació estàndard, representada juntament amb les barres al següent gràfic.



Gràfica 3: Angle de contacte usant una gota d'aigua de les mostres de 0, 30, 60 i 90 minuts d'atac.

Tal com s'observa a la figura, l'angle de contacte entre la gota i la superfície té una clara tendència a disminuir com més llarga és la duració de l'atac. D'aquesta manera s'observa com l'atac fa que la

superfície del titani passi de ser hidrofòbica a ser hidrofílica. Es pot observar també aquesta tendència amb les següents imatges, obtingudes a partir de la presa de les mesures anteriors.



*Figura 17: Angle de contacte de les mostres amb una gota d'aigua. 0 minuts a dalt a l'esquerra, 30 minuts a dalt a la dreta, 60 minuts a baix a l'esquerra i 90 minuts a baix a la dreta.*

La hidrofília pot ser modificada segons la topografia de la superfície [35], [36] i la tendència dels resultats correspon amb la proposada a la literatura. La mida de les estructures de la superfície, doncs, altera el valor de l'angle de contacte amb el titani. En el cas de la nanotopografia projectada en aquest assaig, fa que aquest angle disminueixi d'un valor mig d'uns  $75^\circ$  (titani llis, 0 minuts d'atac) a uns  $30^\circ$  (nanorugositat, 90 minuts d'atac).

De tota manera, cal remarcar la diferència del valor de l'angle de contacte del titani llis calculat en aquest projecte ( $75^\circ$ ), amb els resultats de l'angle de contacte consultats a la literatura i al propi article base al qual estem fent referència en aquest projecte [1], els quals són notablement més baixos ( $45^\circ$ - $50^\circ$ ). Aquest fet pot ser degut a errors comesos durant el procés de polir; que no s'arribés a una superfície completament llisa.



#### 4.1.1.3. Fotografies amb SEM

Ja que es disposa d'una imatge feta amb SEM de l'aspecte que té la superfície del titani un cop atacada 90 minuts segons Rodríguez-Contreras, et al. 2018 [1], es vol el mateix per poder comprar aquest aspecte amb el de les mostres atacades pel projecte.

L'aspecte a replicar, és a dir, el presentat a l'article, és el següent:

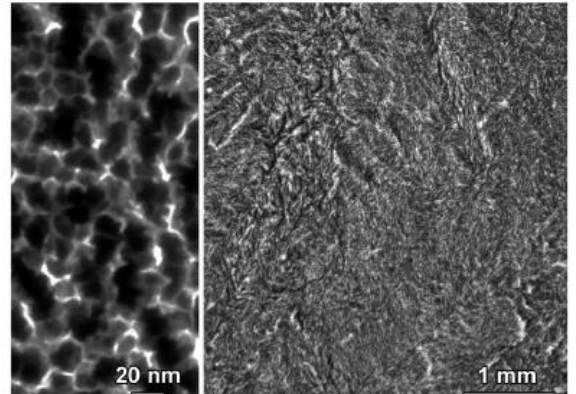


Figura 18: Fotografia amb SEM de la mostra atacada 90 minuts segons l'article de Rodríguez-Contreras, et al. 2018.

Així doncs, es disposa dels quatre tipus de mostres del projecte i es fan les fotografies amb el SEM per a comparar aquest aspecte.

En primer lloc cal remarcar que mitjançant les imatges del SEM es va observar que l'atac no es produïa d'una forma homogènia, tal com es mostra a la següent figura.

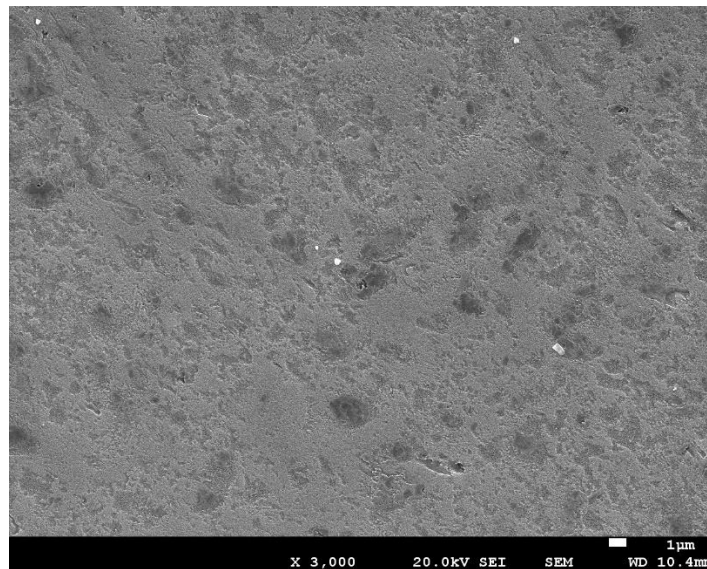


Figura 19: Fotografia amb SEM de la superfície de la mostra atacada 90 minuts amb solució Piranha, a 3.000 augments.

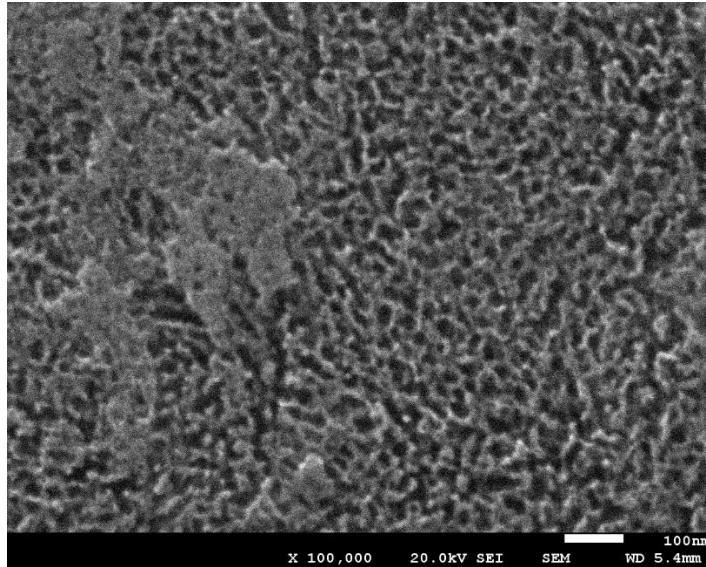


Figura 20: Fotografia amb SEM de la superfície de la mostra atacada 90 minuts amb solució Piranha, a 100.000 augments.

Si es compara aquesta última imatge amb la part esquerra de la imatge de l'article, es pot veure certa semblança en la forma i la mida dels porus, cosa que fa pensar que la superfície creada és relativament com la desitjada de replicar. De totes formes, tal com es pot veure tan en la imatge augmentada com l'altre, es pot veure clarament com l'atac no és homogeni, és a dir, no totes les zones de la superfície de la mostra han estat atacades amb la mateixa intensitat. Això, és clar, no és el desitjable, ja que els bacteris que entressin en contacte amb el titani, podrien tenir més o menys afinitat segons la zona de contacte.

#### 4.1.2. Assajos amb bacteris

##### 4.1.2.1. Primer assaig

Es va fer un primer assaig de bacteris amb *Staphylococcus Aureus* amb el mètode de comptatge amb plaques, tal com s'explica a l'apartat de Materials i Metodologia en aquest document. De cada tipus de mostra (0 min, 30 min, 60 min, 90 min) se'n disposaven 3 unitats, i el resultat és una mitjana aritmètica dels resultats obtinguts a partir del triplicat.

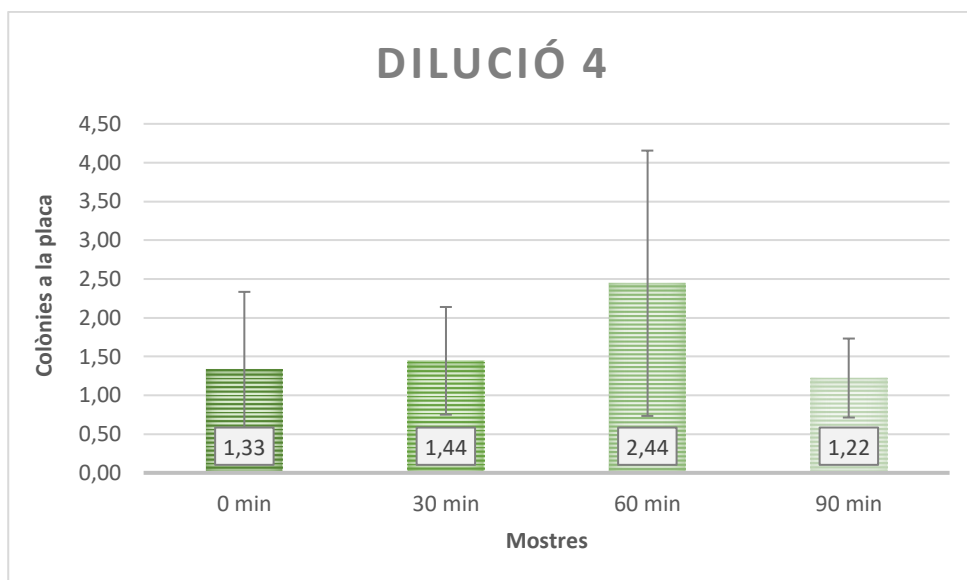
De cada dilució cultivada a la placa (es van cultivar la dilució 2, la 3 i la 4), es va fer una mitjana aritmètica del nombre de bacteris trobats a cada una de les tres gotes de 5  $\mu$ L, i el resultat fou el següent:



Gràfica 4: Representació gràfica de la dil·lució 2 del nombre de colònies de *Staphylococcus Aureus* a les plaques.



Gràfica 5: Representació gràfica de la dil·lució 3 del nombre de colònies de *Staphylococcus Aureus* trobades a les plaques.



Gràfica 6: Representació gràfica de la dil·lució 4 del nombre de colònies de *Staphylococcus Aureus* trobades a les plaques.

Com mostren les figures anteriors, no es va observar cap mena de tendència de reducció del nombre de bacteris amb l'augment de l'atac àcid. La comparativa amb l'article de Rodríguez-Contreras, et al. 2018 [1], es totalment adversa, ja que als seus assajos de bacteris, la reducció del nombre de bacteris quan s'aplica l'atac durant 90 minuts respecte el titani llis (0 minuts) és pràcticament del 97%.

A continuació, unes imatges d'algunes les plaques amb les colònies de bacteris de les quals es van extreure els resultats mostrats. També en elles es pot veure que no s'observa cap reducció del nombre de colònies a mesura que augmenta la durada de l'atac.

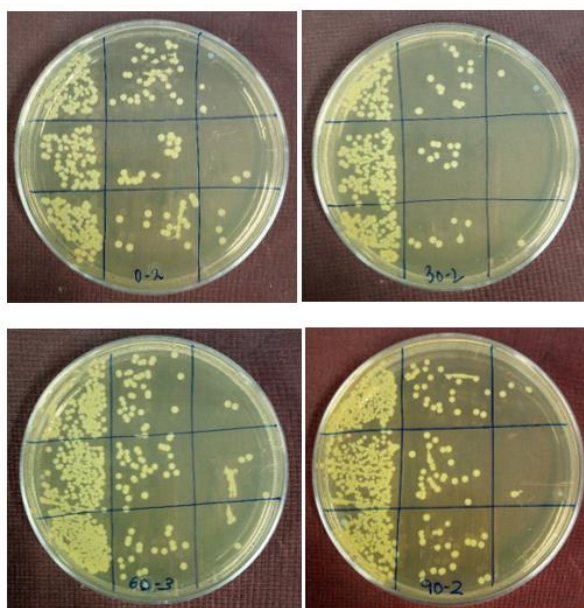


Figura 21: Algunes de les plaques de cultiu amb les colònies de *Staphylococcus Aureus*.

Cal remarcar, per no crear confusió, el fet de que les colònies desenvolupades a les plaques no són tots els bacteris que originalment es van adherir a la superfície de les mostres, ja que durant el procés de cultiu es van dur a terme quatre dilucions 1:10 (que impliquen una de 1:10.000), i solament es van cultivar tres gotes de 5 µL cada una, d'un total de 1000 µL, és a dir un 1'5% del total.

#### 4.1.2.2. Segon assaig

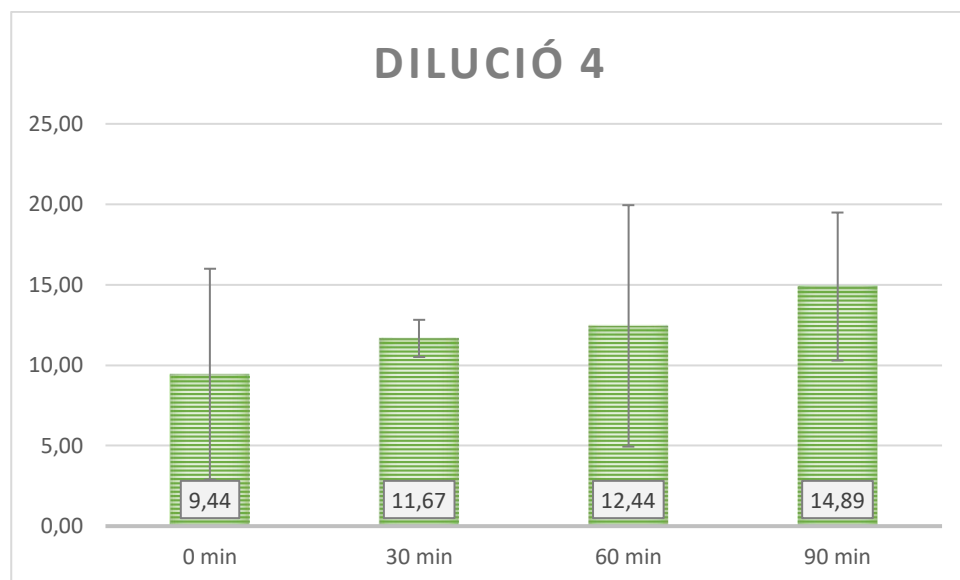
Es va dur a terme un segon assaig per provar de verificar/ratificar els resultats obtinguts amb el primer. Es va fer la mateixa manera que l'anterior, però es va canviar la soca de bacteris. Per a aquest es va usar *Escherichia Coli*, que és la soca de bacteris que es va usar a l'estudi del qual se n'intenta replicar la superfície.

A l'hora de comptar les colònies de bacteris de les plaques es va observar que amb aquesta nova soca les colònies esdevenien més petites i difuminades, així que més difícils de comptabilitzar. És per això que en aquest cas només es van tenir en compte les dilucions 3 i 4 degut al gran error que es cometia a l'hora de comptar les colònies de la dilució 2.



Gràfica 7: Representació gràfica de la dil·lució 3 del nombre de colònies d'*Escherichia Coli* trobades a les plaques.





Gràfica 8: Representació gràfica de la dil·lució 4 del nombre de colònies d'*Escherichia Coli* trobades a les plaques.

Contràriament a l'esperat, els resultats mostren una petita tendència a augmentar el nombre de bacteris adherits segons augmenta, també, l'atac.

A continuació, es mostren algunes de les plaques d'on es van comptar els resultats mostrats.

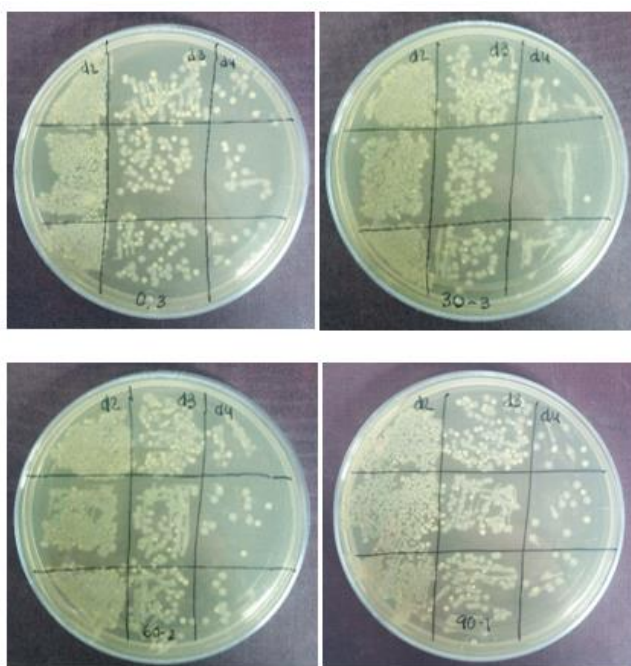


Figura 22: Algunes de les plaques de cultiu amb les colònies d'*Escherichia Coli*

Arrel d'aquests resultats, es decideix fer un tercer assaig i fer el comptatge de bacteris mitjançant SEM i no mitjançant el mètode de comptatge de plaques.

#### 4.1.2.3. Tercer assaig

Tal com s'ha esmentat prèviament, aquest assaig es va dur a terme usant el mètode de comptatge per SEM i no per colònies a les plaques. Aquest és el mètode que s'usa a l'article [1].

A l'apartat de Materials i Metodologia d'aquest document es pot trobar el protocol que s'ha usat per arribar al punt on es disposa de les mostres de titani amb els bacteris adherits fixats. A la superfície d'aquestes mostres se'ls va fer fotografies usant el microscopi, i en elles es va poder observar el següent:

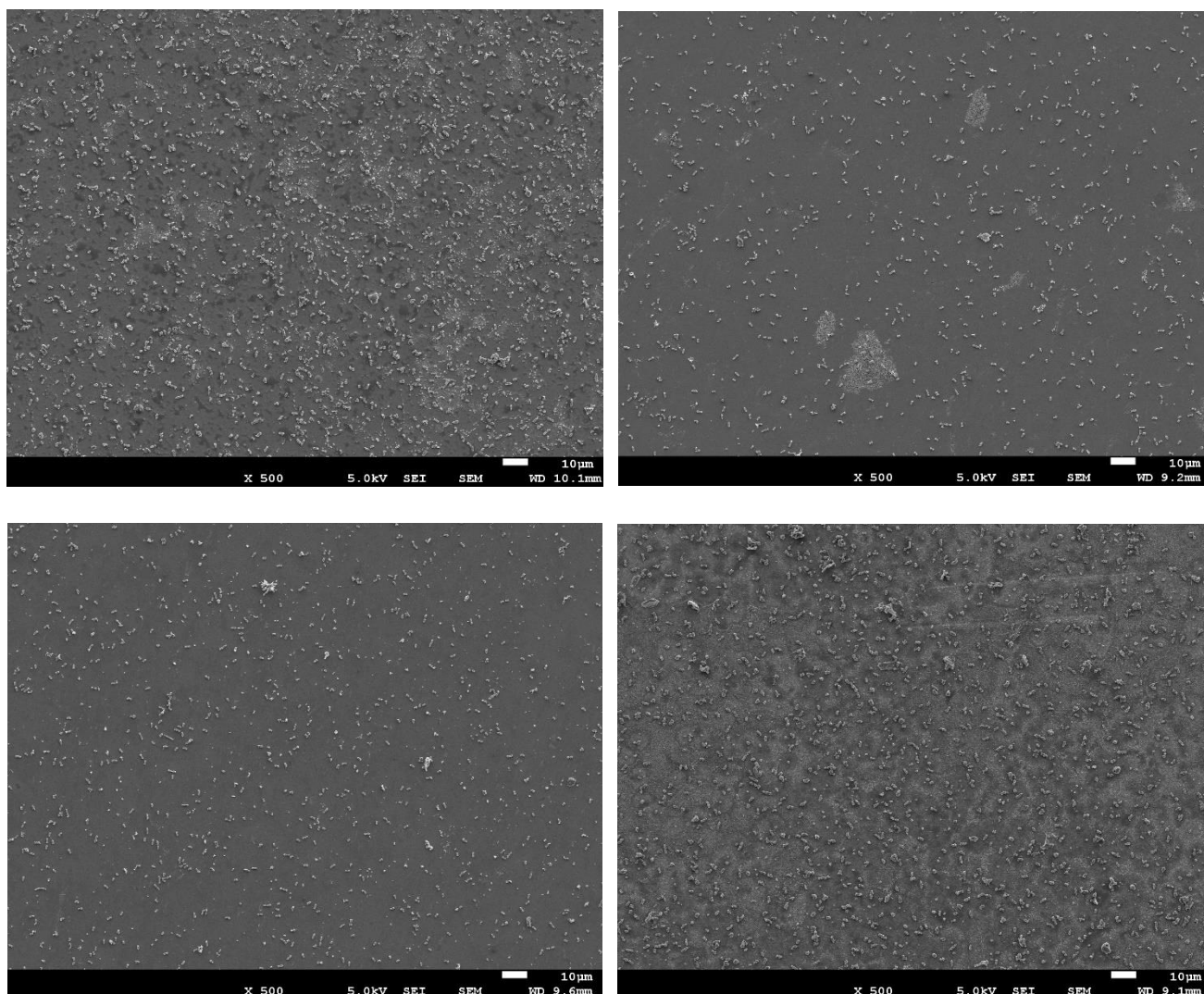


Figura 23: Fotografies amb SEM de les mostres amb bacteris de l'assaig adherits. 0 minuts a dalt a l'esquerra; 30 minuts a dalt a la dreta, 60 minuts a baix a l'esquerra i 90 minuts a baix a la dreta.

Concordant amb els resultats dels assajos anteriors, no s'observa una disminució de la població de bacteris a mesura que augmenta la durada de l'atac. De totes formes, es pot observar una lleugera disminució d'aquesta població a la mostra atacada 30 minuts.

## 4.2. Segona Etapa

La segona etapa d'aquest projecte tracta de reproduir els efectes del TESPASA [2] sobre la superfície de titani que s'hagi triat com a més antibacteriana a la primera etapa del projecte. Cal fer una sèrie d'aclariments previs, però.

Després d'analitzar els resultats de la primera etapa, es va arribar a la conclusió de que no podíem dur a terme la reproducció de la superfície presentada en l'article de Rodríguez-Contreras, et al. 2018 [1], per motius desconeguts. D'aquesta forma, l'objectiu del projecte es desviava lleugerament.

En aquest punt del projecte, es va poder establir contacte amb un dels autors de l'article [1], i aquest va aconsellar que es provés amb un atac de 150 minuts en comptes de 90. Així doncs, la primera qüestió a tenir en compte en aquesta segona etapa era que l'atac amb *Piranha* fos més llarg.

Per altra banda, a arrel dels resultats obtinguts amb les fotografies del SEM a la superfície de les mostres atacades, es va decidir provar de canviar la concentració de la solució *Piranha* amb l'objectiu d'acostar-se més a l'aspecte presentat a l'article original. Així, si la solució era d'una concentració 50% d'àcid sulfúric i 50% de peròxid d'hidrogen; ara passaria a ser 75% d'àcid sulfúric i 25% de peròxid d'hidrogen, per a pronunciar més les nano-estructures que es van trobar a la superfície.

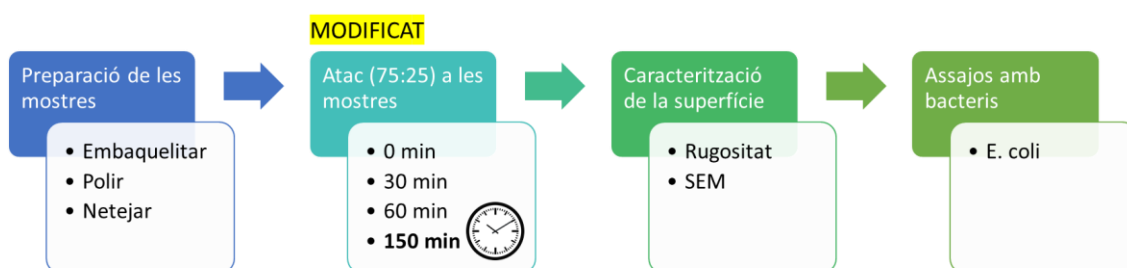


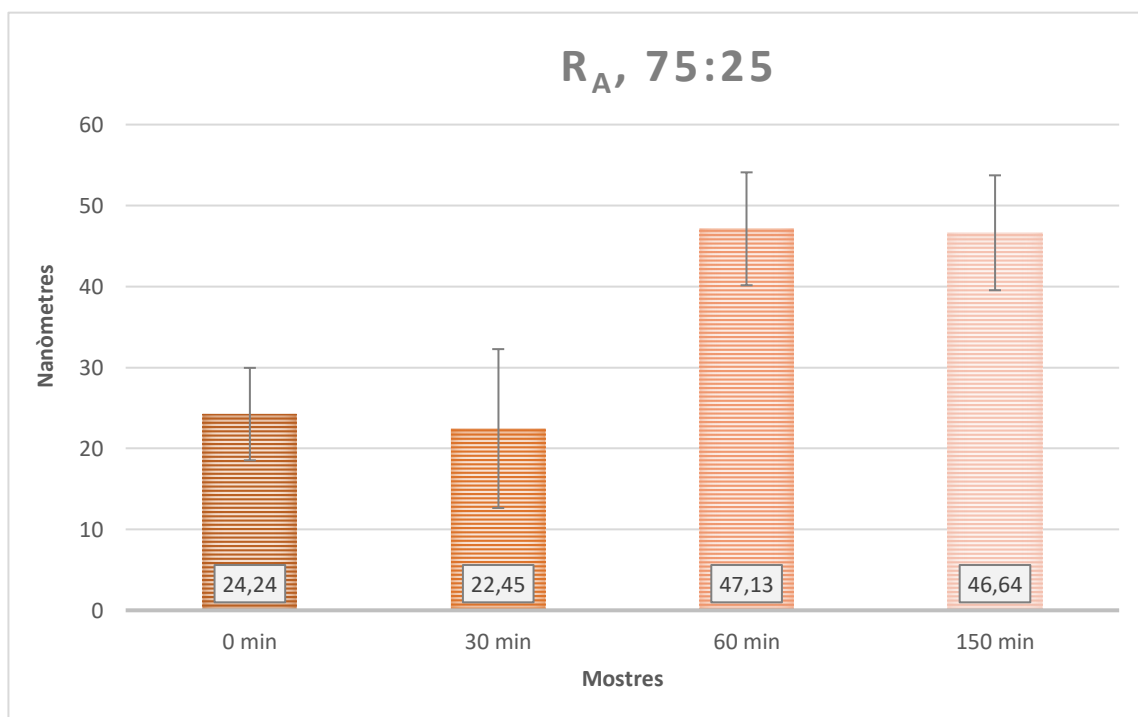
Figura 24: Representació de les activitats de la segona etapa del projecte.



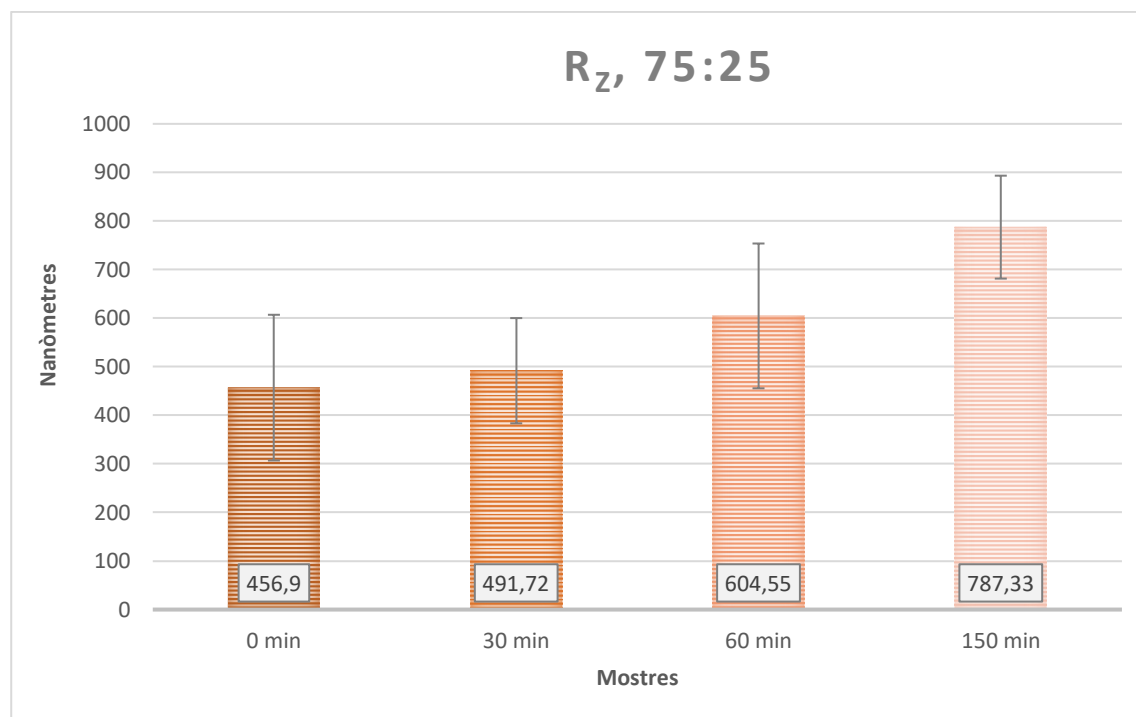
#### 4.2.1. Caracterització de la superfície

##### 4.2.1.1. Rugositat

A l'igual que a la primera etapa, mitjançant la interferometria òptica s'han calculat la rugositat mitja aritmètica ( $R_A$ ) i la rugositat parcial ( $R_z$ ) dels diferents tipus de mostres. En aquest cas es disposa de tres tipus de mostres, les quals han estat atacades amb una solució Piranha amb la concentració canviada, és a dir, 75% àcid sulfúric i 25% peròxid d'hidrogen: 30 minuts d'atac, 60 minuts d'atac i 150 minuts d'atac. De cada mostra de n'han analitzat cinc zones diferents, de les quals se n'ha fet a mitjana aritmètica i se n'ha calculat l'error mitjançant la desviació estàndard.



Gràfica 9: Rugositat mitja expressada en nanòmetres de les mostres de 0, 30, 60 i 90 minuts d'atac modificat.



Gràfica 10: Rugositat parcial expressada en nanòmetres de les mostres de 0, 30, 60 i 90 minuts d'atac modificat

Els valors de la rugositat respecte l'atac de la primera etapa, amb concentració 50:50, han disminuït lleugerament, cosa que dona lloc a pensar que és el peròxid d'hidrogen el que crea aquesta rugositat a la superfície del titani. De totes formes, es continua marcant la tendència a augmentar la rugositat a mesura que augmenta el temps d'exposició a la solució.

Tot i haver disminuït els valors, no s'arriba al valor de rugositat mitja presentat a l'article [1].

#### 4.2.1.2. Fotografies amb SEM

Amb les mostres atacades amb la solució *Piranha* de concentració modificada, també es van fer fotografies amb el SEM per veure si l'aspecte de les estructures de la superfície donava l'efecte punxegut que sembla que dona a l'article [1].

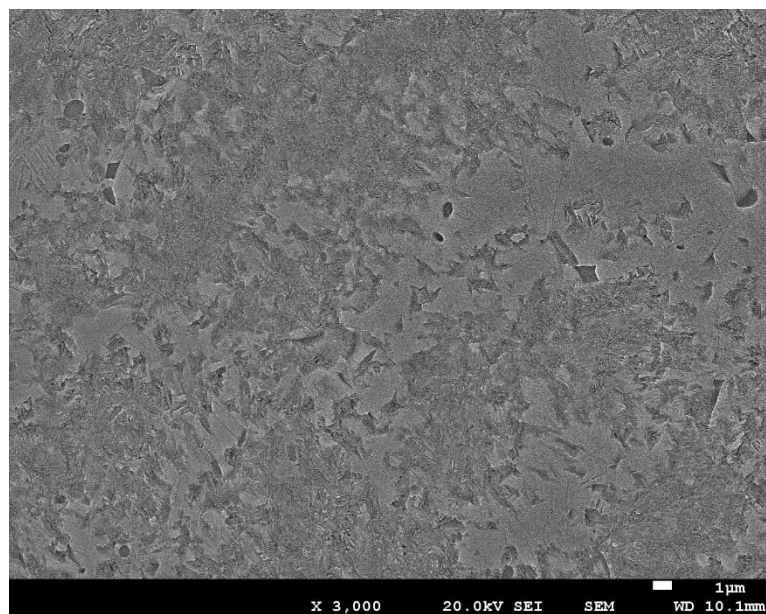


Figura 25: Fotografia amb SEM de la superfície de la mostra atacada 150 minuts amb solució Piranha modificada, a 3.000 augments

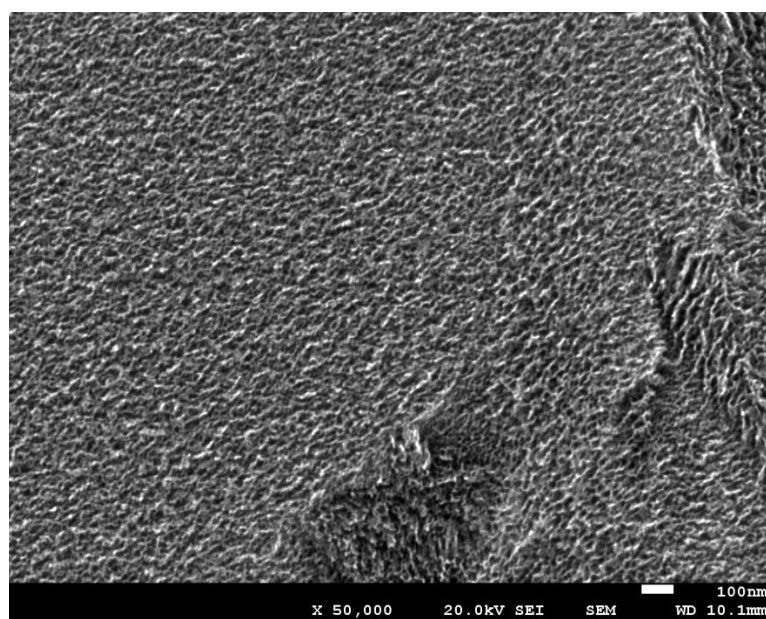


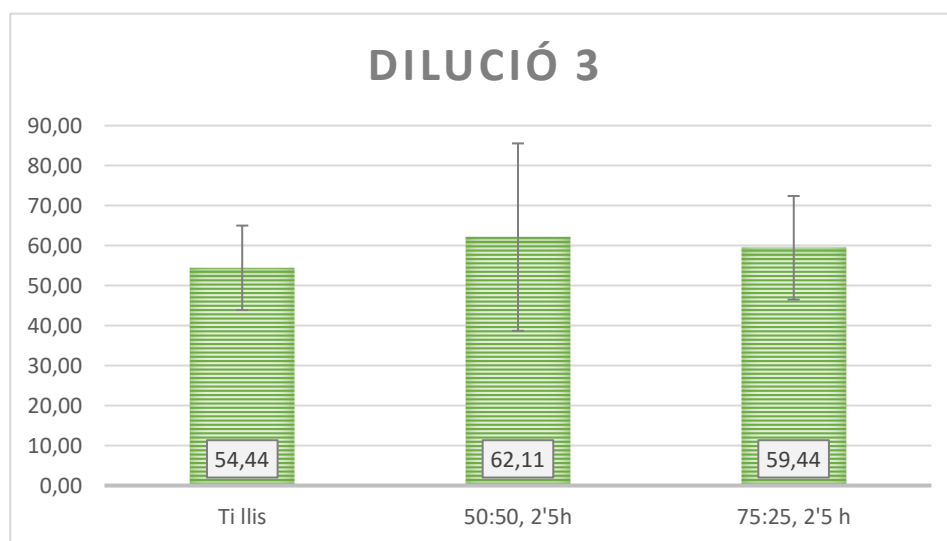
Figura 26: Fotografia amb SEM de la superfície de la mostra atacada 150 minuts amb solució Piranha modificada, a 50.000 augments.

## 4.2.2. Assajos amb bacteris

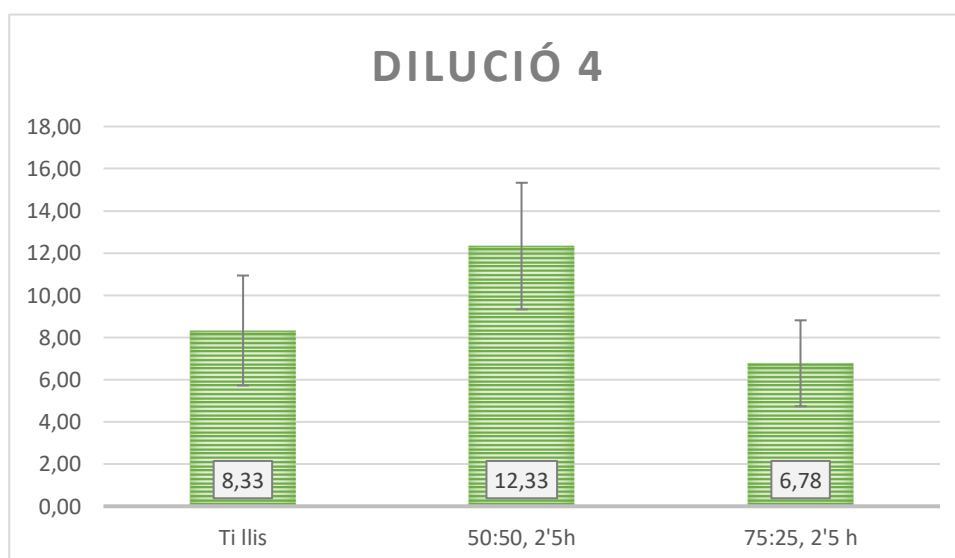
### 4.2.2.1. Quart assaig

Es va dur a terme un assaig amb les mateixes condicions que la resta d'assajos, però es van dur a terme les dues tècniques de comptatge alhora, és a dir, es van preparar mostres per a cultivar sobre plaques i també se'n van preparar per a observar al SEM. La soca bacteriana usada va ser *E. Coli*.

Per a fer aquest assaig es van tornar a preparar mostres, però aquesta vegada la durada de l'atac sempre va ser la mateixa: 150 minuts. El que es va estudiar va ser la relació entre la concentració de la solució Piranha i l'adhesió de bacteris, i els resultats són els següents:



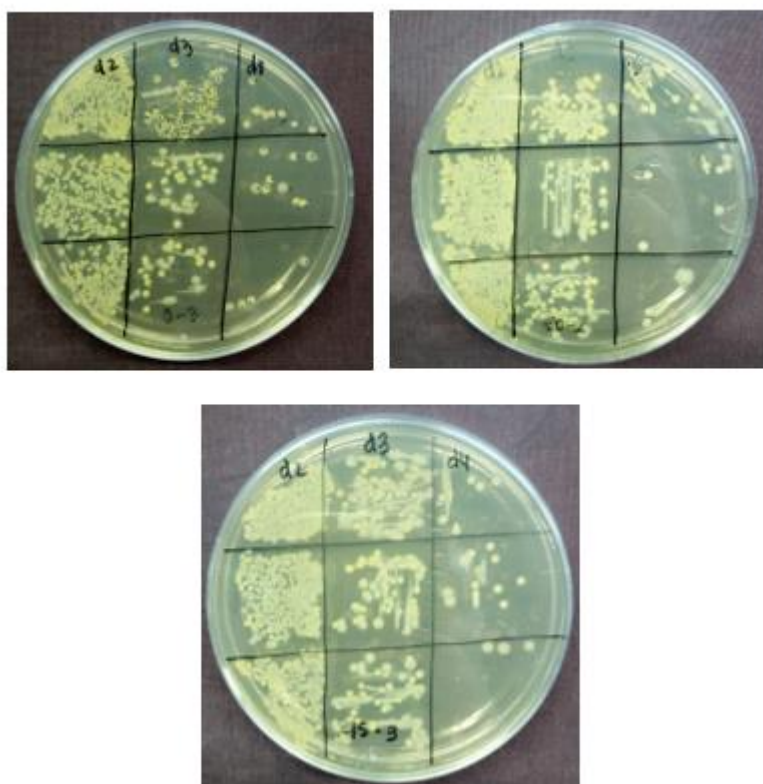
Gràfica 11: Representació gràfica de la dil·lució 3 del nombre de colònies d'*Escherichia Coli* trobades a les plaques.



Gràfica 12: Representació gràfica de la dil·lució 4 del nombre de colònies d'*Escherichia Coli* trobades a les plaques.

Els resultats de l'adhesió de bacteris de les mostres atacades respecte el titani llis no milloren notablement en les dues dilucions estudiades. Però el que sí es pot observar és el que el resultat de la concentració 75:25 respecte a l'efecte antibacterià, és millor que el de la concentració 50:50.

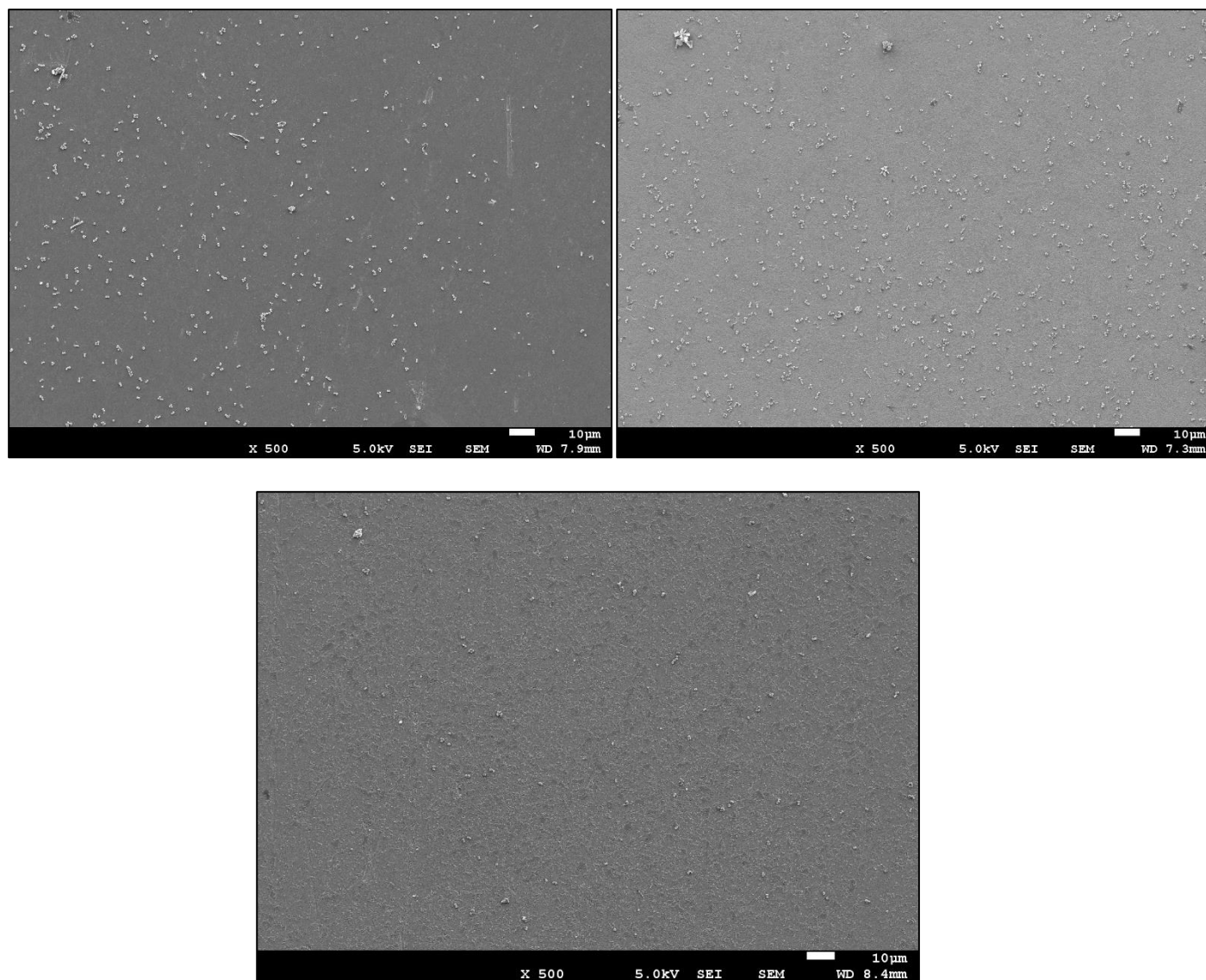
A continuació, les fotografies d'algunes de les plaques obtingudes.



*Figura 27: Algunes de les plaques de cultiu amb colònies d'Escherichia Coli.*



Les fotografies obtingudes amb el SEM van mostrar el següent:



*Figura 28: Fotografies amb SEM dels bacteris de l'assaig adherits. Titani llic (0 minuts) a dalt a l'esquerra; atac 50:50 (150 minuts) a dalt a la dreta; atac 75:25 (150 minuts) a baix.*

A les fotografies s'observa un resultat molt similar a l'obtingut amb el comptatge de plaques: una reducció de bacteris adherits a la mostra atacada amb una solució 75:25 de concentració respecte la de 50:50.

Clarament, no s'ha assolit el 97% de reducció que aconseguixen Rodríguez-Contreras, et al. 2018 [1], per motius desconeguts, però l'efecte antibacterià amb la concentració modificada sembla funcionar lleugerament millor.

### 4.3. Tercera etapa

Finalment s'assoleix la tercera etapa del projecte, on es pretén fer un recull de resultats obtinguts en les dues primeres etapes i escollir la millor condició i més antibacteriana per fer un assaig complet amb diverses soques de bacteris i, el més important, afegint l'efecte antibacterià del silà TESPSA.

Aquest assaig es va dur a terme fent l'atac àcid a les mostres amb la solució modificada, és a dir, 75% àcid sulfúric i 25% peròxid d'hidrogen. Els motius de l'elecció van ser tres:

- Els resultats del nombre de bacteris adherits a les mostres van ser menors.
- L'atac va resultar més homogeni per les diverses zones de les mostres.
- A l'haver més superfície específica, es podria recobrir més zona amb TESPSA, i seria més antibacterià.

En aquest assaig, es van estudiar quatre tipus de mostres:

- A: Titani llis sense TESPSA
- B: Titani rugós sense TESPSA
- C: Titani llis amb TESPSA
- D: Titani rugós amb TESPSA



Figura 29: Il·lustració dels quatre tipus de mostres analitzades a la tercera etapa.

Es van preparar 36 mostres i la meitat es van sotmetre a un atac de 150 minuts amb solució Piranha de concentració 75%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  i 25%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . 9 de les mostres no atacades i 9 de les mostres sí atacades es van silanitzar amb TESPSA i es van obtenir 9 mostres de cada classe (A, B, C, D) per fer tres assajos de bacteris, que seran anomenats el cinquè, el sisè i el setè assaig, per no confondre's amb els duts a terme a la primera i segona etapa.

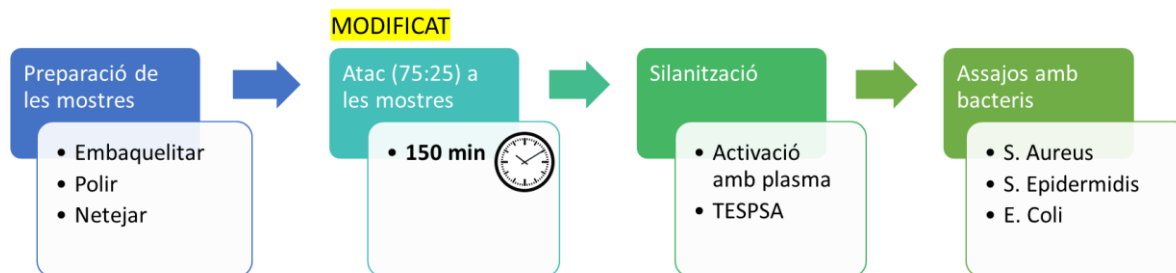
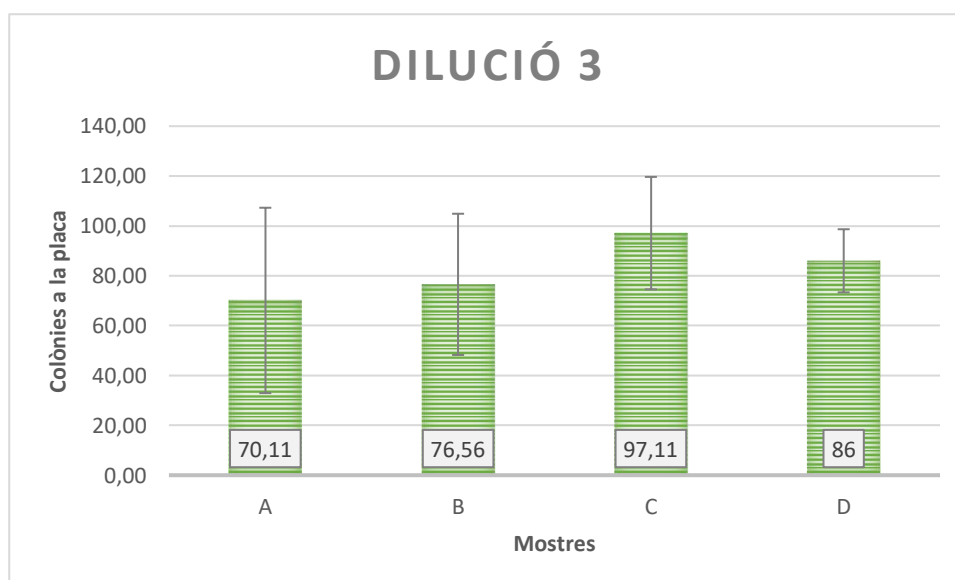


Figura 30: Representació de les activitats de la tercera etapa del projecte.

#### 4.3.1. Assajos amb bacteris

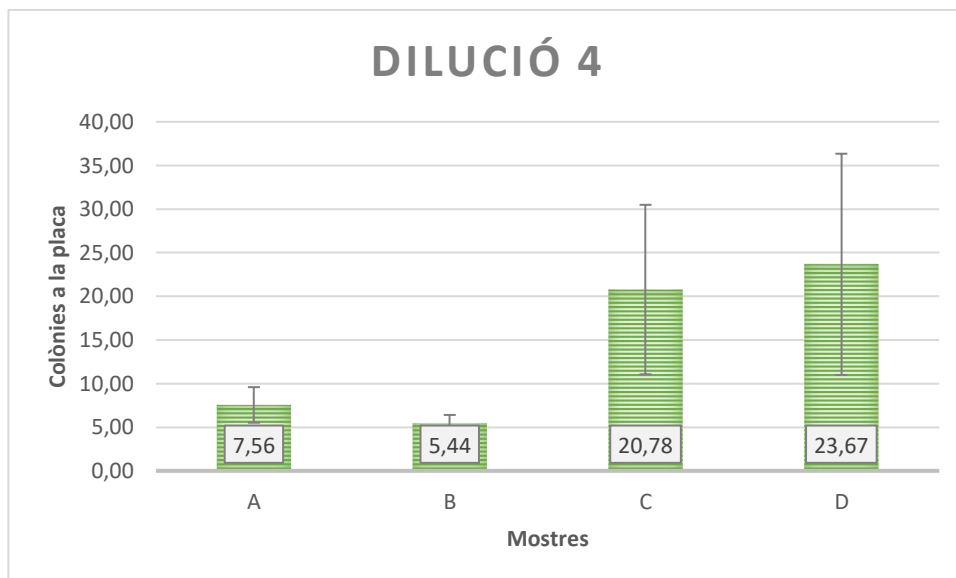
##### 4.3.1.1. Cinquè assaig

Es va dur a terme l'assaig bacterià amb les mateixes condicions que els anteriors i amb la soca de bacteris *Staphylococcus Aureus*. Per comptar els bacteris adherits a la mostra, es va usar el mètode de comptatge de colònies a plaques, tot i que també es van preparar mostres per a fer fotografies amb el SEM.



Gràfica 13: Representació gràfica de la dil·lució 3 del nombre de colònies de *Staphylococcus Aureus* trobades a les plaques.





Gràfica 14: Representació gràfica de la dil·lució 4 del nombre de colònies de *Staphylococcus Aureus* trobades a les plaques

Els resultats que es poden observar no segueixen cap tendència. La nanorugositat de les mostres B i D no sembla afectar l'adherència dels bacteris i l'ús de TESPSA tampoc sembla modificar-ho. Cal dir que Godoy-Gallardo, et al. 2016 [2], no usen la soca *S. Aureus* per a dur a terme els seus assajos, sinó que usen *S. Sanguinis* i *S. Salivarius*, cosa que com s'ha explicat al punt 2.2.2, pot ser la font de diferències.

A continuació també es poden observar algunes de les plaques resultants d'aquest assaig:

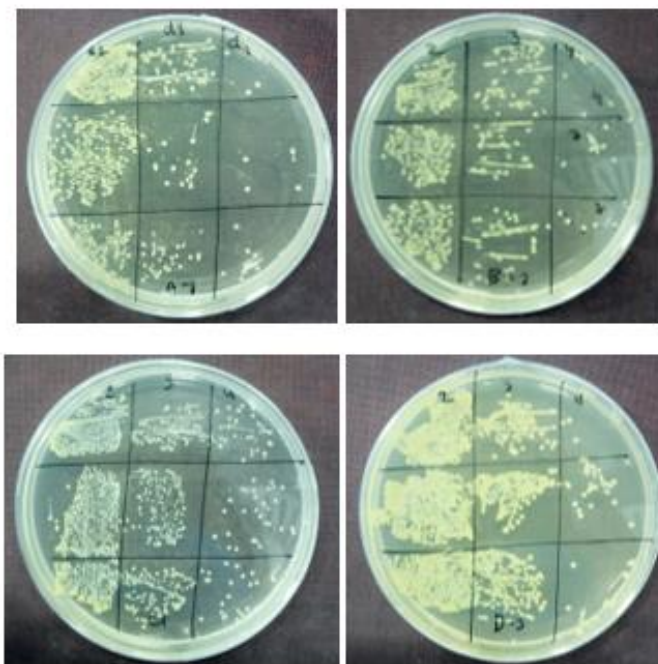


Figura 31: Algunes de les plaques de cultiu amb colònies de *S. Aureus*.

Les fotografies obtingudes amb el SEM són les següents:

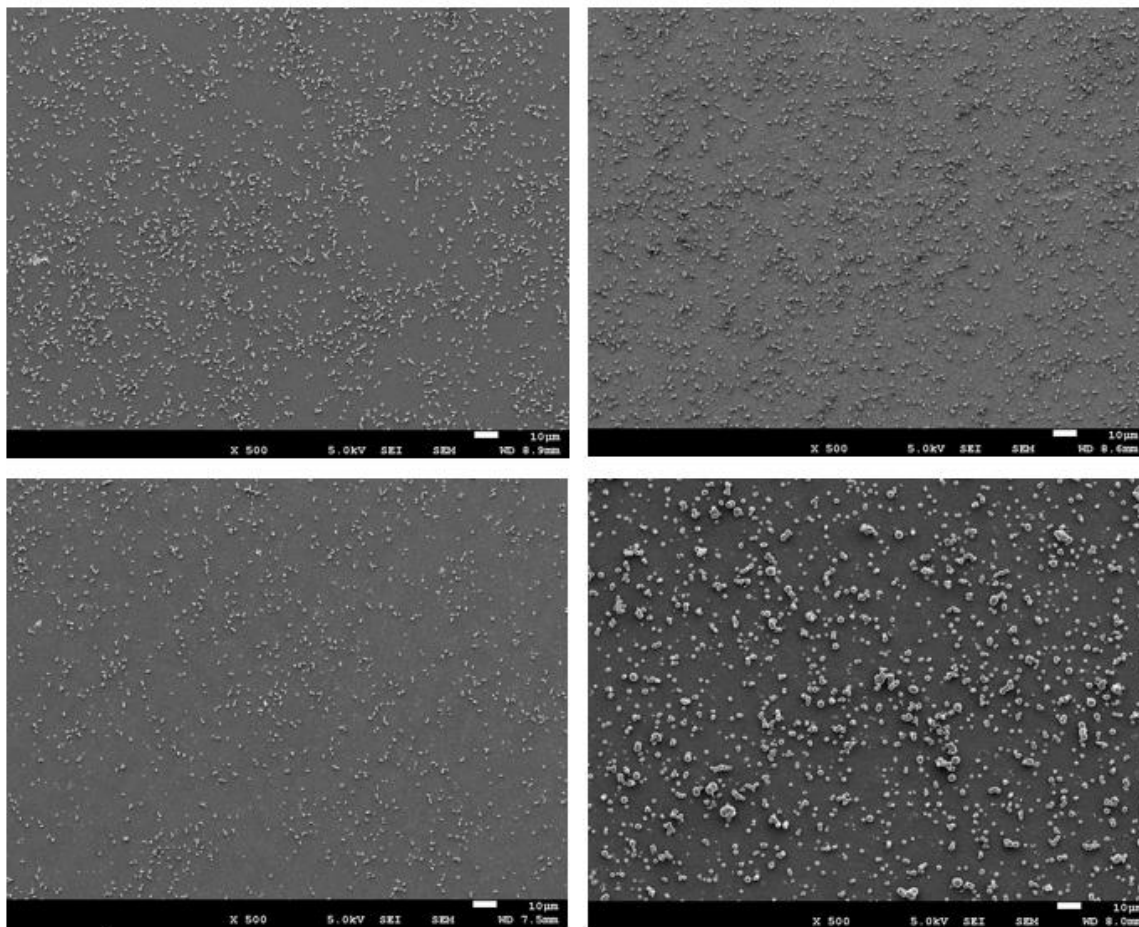
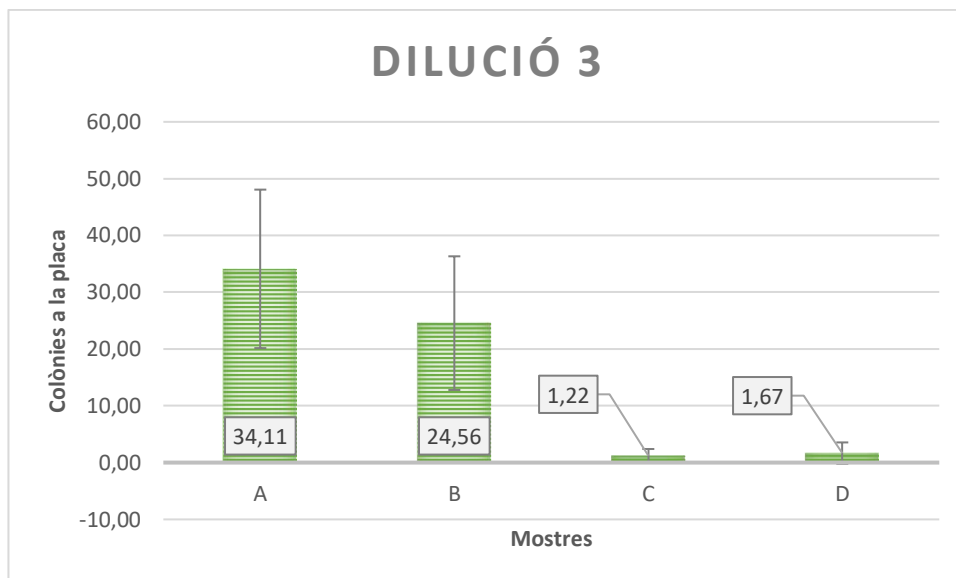


Figura 32: Fotografies amb SEM de la superfície de les mostres amb els bacteris adherits. A (a dalt a l'esquerra); B (a dalt a la dreta); C (a baix a l'esquerra); D (a baix a la dreta).

A les fotografies es pot veure també que no se segueix cap tendència. De totes formes cal remarcar dues coses. La primera és que aquestes fotografies es van fer de zones molt petites en comparació al que era la mostra sencera, i cada zona presentava una distribució i quantificació lleugerament diferent de bacteris. Tal com s'explica a l'apartat 3.1.5.5 d'aquest document, aquest mètode de comptatge de bacteris és relatiu. La segona cosa que cal remarcar és la sospitada contaminació de la mostra D. Tot i que les quatre fotografies estan fetes amb 500 augments, sembla que la mida dels cossos que es troben a la mostra D no corresponen als bacteris cultivats sobre ella.

#### 4.3.1.2. Sisè assaig

Igual que l'anterior, es va dur a terme un sisè assaig, amb les mateixes condicions però amb *Staphylococcus Epidermidis* com a soca.



Gràfica 15: Representació gràfica de la dil·lució 3 del nombre de colònies de *Staphylococcus Epidermidis* trobades a les plaques



Gràfica 16: Representació gràfica de la dil·lució 4 del nombre de colònies de *Staphylococcus Epidermidis* trobades a les plaques

En aquest cas l'assaig presenta un resultat esperat. En ambdues dilucions es pot observar el decreixement de colònies presents a les plaques, sobretot a aquelles mostres que tenen TESPSA. També es veu una disminució de colònies en B respecte a A, cosa que implicaria l'existència de la funció antibacteriana del tractament superficial aplicat a les mostres. De totes formes, aquest fet no s'observa en la mostra D respecte la C.

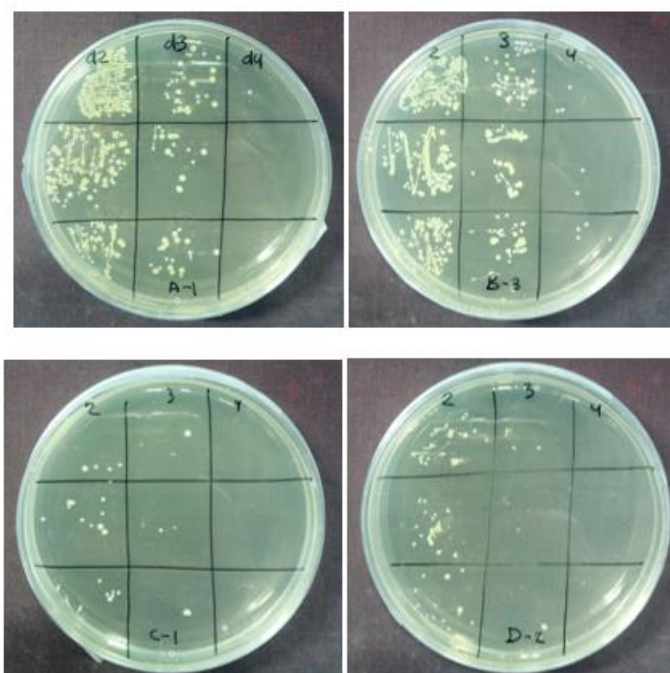


Figura 33: Algunes de les plaques de cultiu amb colònies de *S. Epidermidis*.

També es disposa de les fotografies fetes amb el SEM fetes a altres mostres sotmeses a l'assaig:

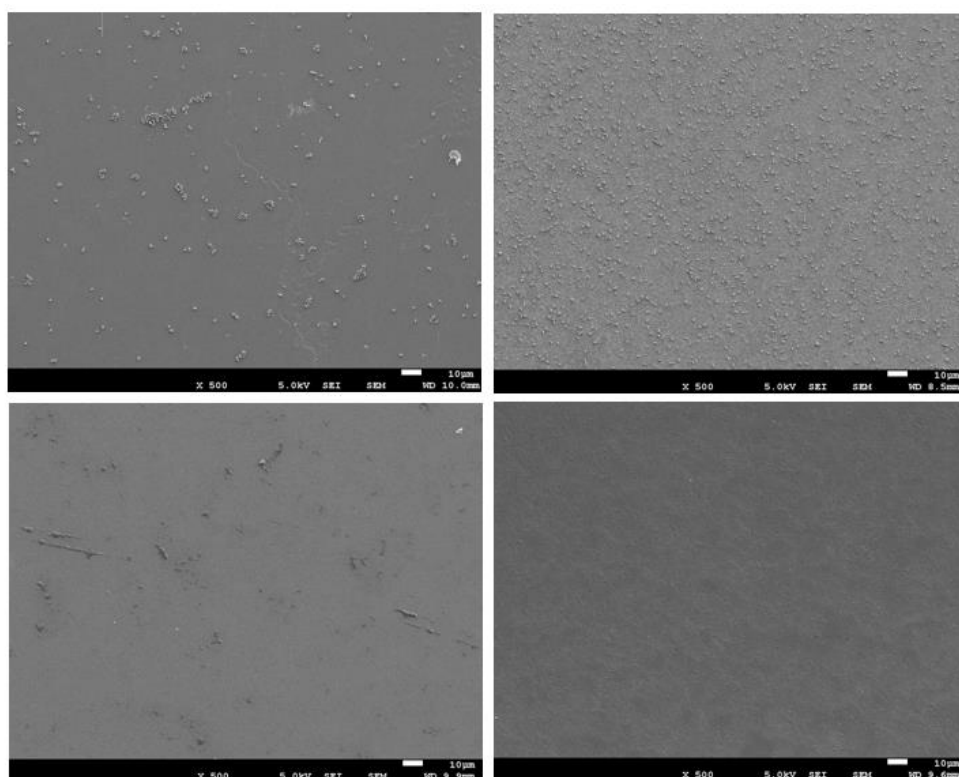
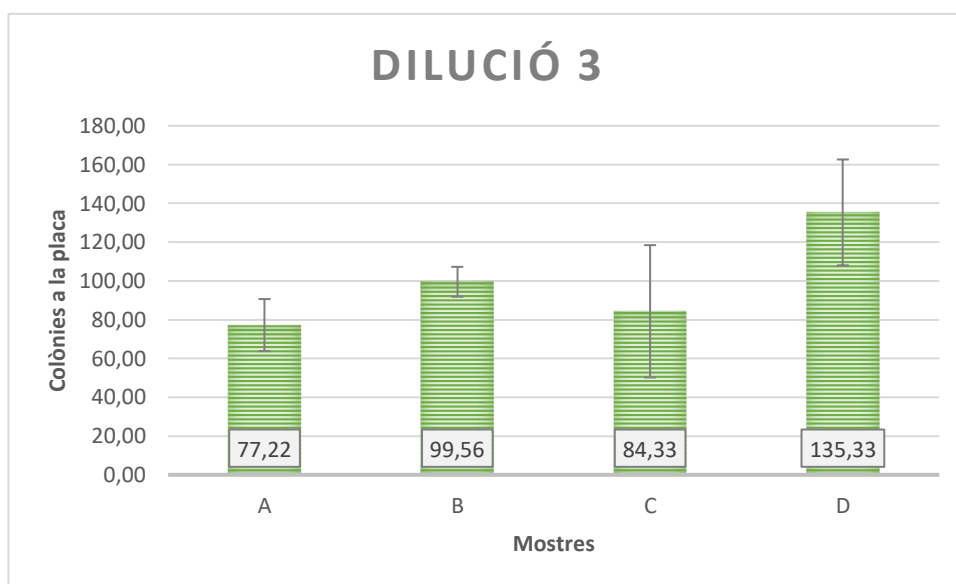


Figura 34: Fotografies amb SEM de la superfície de les mostres amb els bacteris adherits. A (a dalt a l'esquerra); B (a dalt a la dreta); C (a baix a l'esquerra); D (a baix a la dreta).

A les imatges es veu la clara diferència entre les mostres A i B, on sí que es veuen bacteris adherits; i les mostres C i D, on no se'n veuen. Es pot fer la observació que a la mostra A els bacteris es distribueixen formant petits grups de bacteris i a la mostra B es distribueixen més aviat independentment.

#### 4.3.1.3. Setè assaig

L'últim assaig bacterià es va fer amb *Escherichia Coli*; i les mateixes condicions que els altres dos assajos d'aquesta tercera etapa.



Gràfica 17: Representació gràfica de la dil·lució 3 del nombre de colònies d'*Escherichia Coli* trobades a les plaques

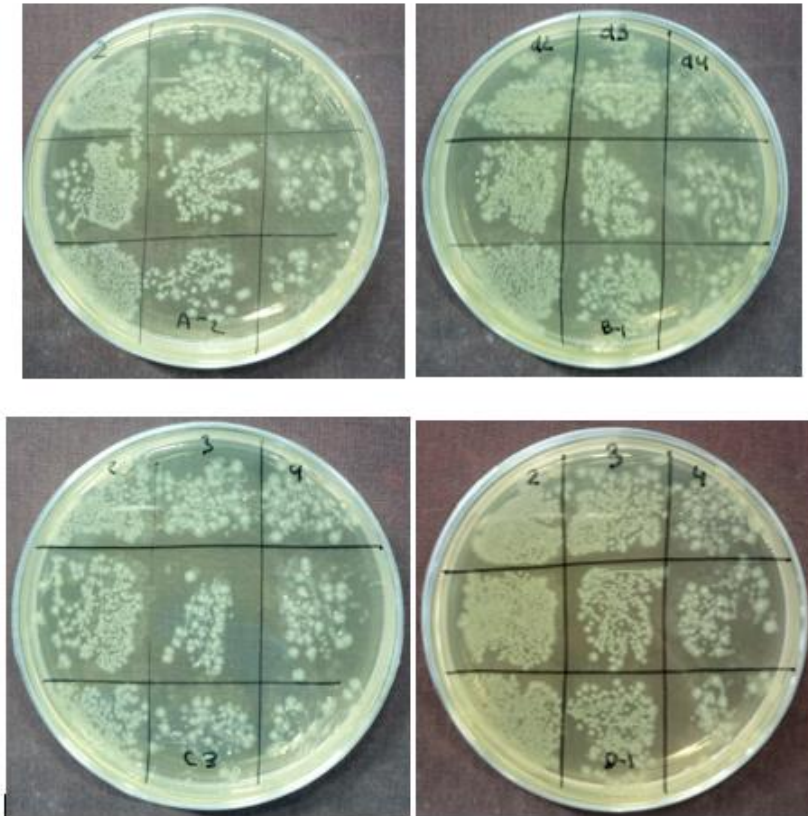


Gràfica 18: Representació gràfica de la dil·lució 4 del nombre de colònies d'*Escherichia Coli* trobades a les plaques



En aquest últim assaig passa com en el primer d'aquesta tercera etapa. No es veuen canvis en l'adhesió de bacteris amb l'efecte de la rugositat (B respecte de A; i D respecte de C) ni tampoc se'n veuen per l'ús del TESPAS (C i D respecte de A i B). *E. Coli* tampoc és una de les soques usades a l'article de Godoy-Gallardo, et al. 2016 [2].

Es poden veure també, a continuació, algunes de les plaques obtingudes de l'assaig.



*Figura 35: Algunes de les plaques de cultiu amb colònies de E. Coli.*

D'aquest assaig no es disposa de fotografies fetes amb el SEM ja que degut a algun problema desconegut quan les mostres es van observar amb el microscopi, no es van trobar *E. Coli* adherides. Se sospita que es cometés algun error a l'hora de fixar els bacteris, activitat descrita a l'apartat 3.1.5.5.

## CONCLUSIONS

En aquest projecte s'ha estudiat l'efecte antibacterià de la superfície de mostres de titani que han estat modificades a partir d'un atac àcid amb una solució anomenada *Piranha* i d'una silanització amb TESPSA. El principal objectiu de l'estudi era imitar la superfície antibacteriana de l'assaig de Rodríguez-Contreras, et al. 2018 [1] i afegir-hi l'efecte del silà tal com es descriu a l'article de Godoy-Gallardo, et al. 2015 [2].

Es van preparar mostres de topografia llisa i emmirallada seguint protocols de preparació, poliment i neteja. Es va dur a terme un atac a les mostres amb *Piranha*, una solució composta per 50% d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  i 50%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , la preparació de la qual és exotèrmica i va caldre prendre les precaucions necessàries. Les condicions van ser les mateixes que les descrites a l'assaig [1], de forma que la superfície de les mostres de titani tingués l'efecte antibacterià que es presenta a l'article (reducció d'aproximadament 97% de la població bacteriana).

En la primera etapa del projecte, tot i replicar aquestes condicions, no s'ha aconseguit imitar la superfície esmentada. Els valors de rugositat han estat diferents, per exemple, a l'article es presenta un valor de rugositat mitja  $R_A=13,3$  nm i al projecte  $R_A=58,68$  nm; i després d'una recerca bibliogràfica s'ha pogut concloure que el rang de nanòmetres que els bacteris troben desfavorable per a la seva adhesió és molt específic i condicionat per moltes altres variables [25]. De totes formes s'ha pogut estudiar la hidrofilitat de les mostres mitjançant l'angle de contacte i l'aspecte de la nanotopografia mitjançant el microscopi electrònic de rastreig.

Així doncs, queda demostrat que la correlació entre la variació de rugositat de la superfície del titani i la fixació bacteriana, és un camp on tot i el gran nombre d'investigacions que s'han fet, encara queden moltes conclusions que extreure, com per exemple, el motiu pel qual no s'ha pogut replicar la superfície desitjada en aquest projecte.

Posteriorment, s'ha fet un petit assaig comparatiu entre la solució *Piranha* i una variant seva on s'ha modificat la concentració d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 75:25, respectivament; amb l'objectiu d'un atac més fort i després d'un assaig bacterià ha resultat en una petita reducció de la població de bacteris respecte la solució original. Aquest assaig comparatiu és anomenat com la segona etapa d'aquest projecte. De totes formes, cal d'un estudi més complert per verificar tal resultat, ja que no tots els resultats de l'assaig van ser estadísticament diferents.

Degut als resultats obtinguts a la segona etapa, s'ha decidit provar l'efecte del TESPSA amb les mostres atacades amb la solució modificada, és a dir, d'una concentració 75%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  i 25%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Els resultats d'aquest assaig han mostrat diversitat segons la soca de bacteris usada, però amb la soca *S. Epidermidis* els resultats van mostrar una gran reducció de la població bacteriana a les mostres on el TESPSA era

present. Usant les soques *S. Aureus* i *E. Coli*, els bacteris no van diferenciar entre mostres silanitzades i mostres sense silanitzar, tot i també haver seguit satisfactòriament el procés de silanització.

Per poder avaluar els processos de creació de la superfície nanorugosa i la seva silanització amb TESPSA amb més exactitud, es recomana fer un assaig més exhaustiu, amb més repeticions dels assajos bacterians i fer-los amb diferents soques per provar si l'efecte presentat té viabilitat amb la població bacteriana en general o només amb unes soques de bacteris específiques.



## 5. ANÀLISI DE L'IMPACTE AMBIENTAL

El projecte s'ha dut a terme intentant minimitzar en tot moment l'impacte ambiental que es pogués causar. Però de totes formes, s'ha comès, inevitablement, un petit impacte ambiental.

En general, s'han de tenir en compte els següents fets per a l'anàlisi d'aquest impacte: els residus generats a l'hora de dur a terme l'assaig (font principal de l'impacte) i la despesa de corrent elèctrica de les màquines emprades al laboratori.

El grup BBT treballa amb un detallat protocol de la gestió de materials i residus. A la majoria dels laboratoris es poden trobar diferents contenidors ben diferenciats per a tot tipus de residus, però és al laboratori principal, I.13, on es duu a terme la gestió de residus exhaustiva.

Es disposa d'una zona amb contenidors per separar els residus segons el seu tipus i segons la seva contaminació. És aquí on s'han llençat tots els elements de plàstic, paper o altres, contaminats o no, que s'han usat al llarg del projecte. Alguns dels exemples de residus sòlids produïts són:

- Pots de plàstic, tubs falcon, tubs eppendorf, pipetes Pasteur...
- Xeringues, agulles, puntes de pipeta (tips) ...
- Paper de polir de diferents graus
- Paper per assecar
- Guants

De tota manera, cal destacar que els residus produïts durant els assajos amb bacteris han d'anar a un recipient especialitzat de la cabina de bacteris i no poden llençar-se al mateix lloc que els residus comuns. Aquests residus, al omplir-se el recipient, cal esterilitzar-los usant un autoclau.

Per altra banda, al mateix laboratori es disposa d'una zona de separació de residus en estat líquid, on s'han dipositat les solucions usades. Per fer aquest projecte, s'han separat:

- Solvents **No Halogenats** procedents de la neteja de les mostres: aigua destil·lada, acetona, ciclohexà, isopropanol i etanol.
- Solució **Piranha** de l'atac a les mostres.

Posteriorment, aquests residus que se separen especialment, es duen a un lloc de tractament de residus on seran tractats de forma que es pugui mantenir sota control el seu efecte sobre el medi ambient.



## 6. ANÀLISI ECONÒMICA

En aquest apartat s'hi troba el pressupost del projecte; desglossat i amb els paràmetres de cost. S'agruparan els costos segons les diverses fases del projecte i en aquests es consideren els reactius usats, el material, els equips i la mà d'obra.

CONCEPTE	QUANTITAT	PREU	COST
Barra de titani d'un metre de longitud x 10 mm de diàmetre	0,5 u	368,45€/u	184,23€
<b>COST TOTAL</b>			<b>184,23€</b>

Taula 3: Costos de matèria prima

CONCEPTE	QUANTITAT	PREU	COST
Pinces metàl·liques	2	14,30€/u	28,6€
Espàtula metàl·lica	1	3,50€/u	3,50€
Retolador permanent	1	1,35€/u	1,35€
Drap	1	1€	1€
Multi-well plate	10	13€/u	130€
Pot de plàstic	8	0,75€/u	6€
Tub falcon	20	0,5€/u	10€
Eppendorf	50	0,25€/u	12,5€
Pipeta pasteur	10	0,2€/u	2€
Guants	50	0,08€/u	4€
Nucli magnètic	2	1,5€/u	3€
<b>COST TOTAL</b>			<b>201,95€</b>

Taula 4: Costos de material de laboratori

CONCEPTE	QUANTITAT	PREU	COST
Embutidora Labo Press	5 h	10€/hora	50€
Polidora Struers Rotopol 3	40 h	15€/hora	600€

Prensa hidràulica	5 h	10€/hora	50€
Bany d'ultrasons	10 h	10€/hora	100€
Baquelita en pols	1 Kg	1€/kg	1€
Paper de polir P600	20 u	1,50€/u	30€
Paper de polir P1200	30 u	1,50€/u	45€
Paper de polir P2500	30 u	1,5 €/u	45€
Paper de vellut	2 u	20€/u	40 €
SiO <sub>2</sub>	0,75 L	60€/L	45€
Acetona	2 L	16,65€/L	33,30€
Ciclohexà	1 L	50,30€/L	50,30€
Etanol	1 L	25,50€/L	25,50€
Aigua destil·lada	3 L	0,08€/L	0,24€
Personal (Enginyer Júnior)	100 h	10€/h	1000€
<b>COST TOTAL</b>			<b>2115,34 €</b>

Taula 5: Costos de preparació de mostres

CONCEPTE	QUANTITAT	PREU	COST
Agitador magnètic amb control de temperatura	10 h	5€/h	50€
Bany d'ultrasons	1,2 h	10€/h	12€
Àcid sulfúric	0,5 L	57,86€/L	28,93€
Peròxid d'hidrogen	0,5 L	142,52€/L	71,26€
Aigua destil·lada	0,5 L	0,08€/L	0,04€
Personal (Enginyer Júnior)	15 h	10€/h	150€
<b>COST TOTAL</b>			<b>312,23 €</b>

Taula 6: Costos de l'atac a les mostres

CONCEPTE	QUANTITAT	PREU	COST
Activació amb plasma	45 min	5,74€/h	4,3€
Tolué	0,6 L	47,8€/L	23,9€
TESPSA	0,15 mL	142€/100 mL	21,3 €

<b>DIEA</b>	1 mL	42,64€/100mL	0,44€
<b>Isopropanol</b>	100 mL	10€/L	1€
<b>Etanol</b>	100 mL	25,50€/L	2,55€
<b>Acetona</b>	100 mL	16,65€/L	1,67 €
<b>Personal (Enginyer Júnior)</b>	6 h	10€/h	60€
<b>COST TOTAL</b>			<b>115,16 €</b>

Taula 7: Costos de la silanització de mostres

CONCEPTE	QUANTITAT	PREU	COST
<b>Angle de contacte</b>	4 h	14,4€/h	57,6€
<b>Interferometria òptica</b>	6 h	21€/h	126€
<b>SEM</b>	20 mostres	100€/mostra	2000€
<b>Personal (Enginyer Júnior)</b>	15 h	20€/h	300€
<b>COST TOTAL</b>			<b>2483,6€</b>

Taula 8: Costos de la caracterització de superfícies

CONCEPTE	QUANTITAT	PREU	COST
<b>PBS</b>	5 u	1,56€/u	7,8 €
<b>PB</b>	0,5 L	1,5 €/L	0,75 €
<b>Plaques de petri</b>	60	3,8€/u	228 €
<b>Agarosa</b>	90 g	50€/kg	4,5€
<b>BHI</b>	220 g	251,6€/kg	55,35€
<b>Aigua destil·lada</b>	7L	0,08€/L	0,56€
<b>Campana Microbiologia</b>	20 h	25€/h	500 €
<b>Personal (Enginyer Júnior)</b>	30 h	10€/h	300€
<b>COST TOTAL</b>			<b>1096,96 €</b>

Taula 9: Costos dels assajos bacterians

CONCEPTE	QUANTITAT	PREU	COST
Tècnic Angle de contacte	1 h	50€/h	50€
Tècnic Interferometria òptica	1 h	50€/h	50€
Tècnic SEM	4 h	50€/h	200€
Tècnic Campana Microbiologia	3 h	50€/h	150€
Tècnic Plasma	0,5 h	50€/h	35€
<b>COST TOTAL</b>			<b>485€</b>

Taula 10: Costos dels tècnics responsables

CONCEPTE	COST
Ús general del laboratori	1200 €
Direcció del projecte	2000 €
Anàlisi de dades i redacció	1500 €
<b>COST TOTAL</b>	<b>4700 €</b>

Taula 11: Costos generals per dedicació

<b>COST TOTAL DEL PROJECTE</b>	
CONCEPTE	COST
Matèria prima	184,23 €
Material general	201,95 €
Preparació de les mostres	2.115,34 €
Atac a les mostres	312,23 €
Silanització de les mostres	115,16 €
Caracterització de la superfície	2.483,60 €
Assajos bacterians	1.096,96 €
Tècnics	485 €
Dedicació	4.700 €
Extres	1.000 €
<b>COST TOTAL</b>	<b>12.694,47 €</b>

Taula 12: Cost total del projecte

El cost total del projecte ha estat de **12.694,47 €**.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] A. Rodríguez-Contreras, D. Guadarrama Bello, and A. Nanci, "Surface nanoporosity has a greater influence on osteogenic and bacterial cell adhesion than crystallinity and wettability," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 445, pp. 255–261, 2018.
- [2] M. Godoy-Gallardo, J. Guillem-Martí, P. Sevilla, J. M. Manero, F. J. Gil, and D. Rodríguez, "Anhydride-functional silane immobilized onto titanium surfaces induces osteoblast cell differentiation and reduces bacterial adhesion and biofilm formation," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 59, pp. 524–532, 2016.
- [3] H. J. Expert and M. Devices, "Antibacterial surfaces for biomedical devices. Expert Rev Med Devices 6-553-567.pdf," vol. 6, no. Sep, pp. 1–20, 2009.
- [4] G. Cheng, H. Xue, Z. Zhang, S. Chen, and S. Jiang, "A switchable biocompatible polymer surface with self-sterilizing and nonfouling capabilities," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 47, no. 46, pp. 8831–8834, 2008.
- [5] B. Gottenbos, H. C. Van Der Mei, H. J. Busscher, D. W. Grijpma, and J. Feijen, "Initial adhesion and surface growth of *Pseudomonas aeruginosa* on negatively and positively charged poly(methacrylates)," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 10, no. 12, pp. 853–855, 1999.
- [6] T. P. Martin, S. E. Kooi, S. H. Chang, K. L. Sedransk, and K. K. Gleason, "Initiated chemical vapor deposition of antimicrobial polymer coatings," *Biomaterials*, vol. 28, no. 6, pp. 909–915, 2007.
- [7] I. Fundeanu, H. C. van der Mei, A. J. Schouten, and H. J. Busscher, "Polyacrylamide brush coatings preventing microbial adhesion to silicone rubber," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 64, no. 2, pp. 297–301, 2008.
- [8] L. G. Harris, S. Tosatti, M. Wieland, M. Textor, and R. G. Richards, "Staphylococcus aureus adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptide-functionalized poly(L-lysine)-grafted- poly(ethylene glycol) copolymers," *Biomaterials*, vol. 25, no. 18, pp. 4135–4148, 2004.
- [9] E. Ostuni *et al.*, "Self-assembled monolayers that resist the adsorption of proteins and the adhesion of bacterial and mammalian cells," *Langmuir*, vol. 17, no. 20, pp. 6336–6343, 2001.
- [10] K. A. Whitehead, J. Colligon, and J. Verran, "Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 41, no. 2–3, pp. 129–138, 2005.
- [11] C. on E. and T. S. (CETS), N. R. C. National Materials Advisory Board and C. on E. and T. S. (CETS), N. R. C. National Materials Advisory Board, *Titanium: Past, Present, and Future*. Washington, D.&nbsp;C.: National Academy Press, 1983.
- [12] "Titanio- Ocurrencia, Propiedades Y Usos Del Titanio." [Online]. Available: <https://www.acidoacetico.com/titanio/>. [Accessed: 29-Apr-2019].

- [13] D. Rodríguez Rius, "Biomaterials Fonaments de Materials," in *Fonaments dels materials - Estructura dels sòlids*, 2017.
- [14] L. A. Behrndt H., "Estudio de la biocompatibilidad," *Mater. Sci. Eng.*, no. 6, pp. 120–133, 2011.
- [15] J. Black, *Biological Performance of materials*, 4th editio. Boca Raton, 2005.
- [16] F. J. Gil and Y. J. A. Planell, "BIOMECÁNICA-ORIGINALES Aplicaciones biomédicas del titanio v sus aleaciones," *Riomecanica-Originales*, vol. 1, no. c, pp. 34–42, 1993.
- [17] L. M. Bjursten, L. Rasmusson, S. Oh, G. C. Smith, K. S. Brammer, and S. Jin, "Titanium dioxide nanotubes enhance bone bonding in vivo," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 92, no. 3, pp. 1218–1224, 2010.
- [18] S. Ban, Y. Iwaya, H. Kono, and H. Sato, "Surface modification of titanium by etching in concentrated sulfuric acid," *Dent. Mater.*, vol. 22, no. 12, pp. 1115–1120, 2006.
- [19] K. S. Brammer, S. Oh, C. J. Cobb, L. M. Bjursten, H. van der Heyde, and S. Jin, "Improved bone-forming functionality on diameter-controlled TiO<sub>2</sub> nanotube surface," *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 8, pp. 3215–3223, 2009.
- [20] K. Lee, Y. H. Jeong, Y. M. Ko, H. C. Choe, and W. A. Brantley, "Hydroxyapatite coating on micropore-formed titanium alloy utilizing electrochemical deposition," *Thin Solid Films*, vol. 549, no. 3, pp. 154–158, 2013.
- [21] E. S. Kim, Y. H. Jeong, H. C. Choe, and W. A. Brantley, "Formation of titanium dioxide nanotubes on Ti-30Nb-xTa alloys by anodizing," *Thin Solid Films*, vol. 549, pp. 141–146, 2013.
- [22] D. Li *et al.*, "Biomechanical comparison of the sandblasted and acid-etched and the machined and acid-etched titanium surface for dental implants," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 60, no. 2, pp. 325–332, 2002.
- [23] J. Lario-Femenía, A. Amigó-Mata, Á. Vicente-Escuder, F. Segovia-López, and V. Amigó-Borrás, "Desarrollo de las aleaciones de titanio y tratamientos superficiales para incrementar la vida útil de los implantes," *Rev. Metal.*, vol. 52, no. 4, p. 084, 2016.
- [24] J. Hasan, R. J. Crawford, and E. P. Ivanova, "Antibacterial surfaces: The quest for a new generation of biomaterials," *Trends Biotechnol.*, vol. 31, no. 5, pp. 295–304, 2013.
- [25] K. Bazaka, R. J. Crawford, and E. P. Ivanova, "Do bacteria differentiate between degrees of nanoscale surface roughness?," *Biotechnol. J.*, vol. 6, no. 9, pp. 1103–1114, 2011.
- [26] K. A. Whitehead, D. Rogers, J. Colligon, C. Wright, and J. Verran, "Use of the atomic force microscope to determine the effect of substratum surface topography on the ease of bacterial removal," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 51, no. 1, pp. 44–53, 2006.
- [27] Y. J. Oh, N. R. Lee, W. Jo, W. K. Jung, and J. S. Lim, "Effects of substrates on biofilm formation observed by atomic force microscopy," *Ultramicroscopy*, vol. 109, no. 8, pp. 874–880, 2009.
- [28] *Sàpiens : descobreix la teva història*. Enciclopèdia Catalana, 2002.



- [29] B. J. T. R. Kingslake and B. J. T. R. Kingslake, "Interferometer," *Encycl. Br.*
- [30] B. B. Rossi and E. A. D'Alessio, *Fundamentos de óptica : un estudio sistemático de los fenomenos de la óptica física, electromagnética y cuántica*. Reverte, 1978.
- [31] N. Larburu Arrizabalaga, *Máquinas : prontuario : técnicas, máquinas, herramientas*. Thomson, 2005.
- [32] Á. Rodríguez García-Cebadera, "Estudio del ángulo de contacto y de la mojabilidad a alta temperatura de fases líquidas en la sinterización de metales," Universidad Carlos III de Madrid, Leganés, 2010.
- [33] R. American Chemical Society. and R. Tadmor, *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids.*, vol. 20. American Chemical Society, 1985.
- [34] "Activación de la superficie | Activación con Plasma | Thierry Corp Mexico," 2018.
- [35] J. Li *et al.*, "Controlling mesenchymal stem cells differentiate into contractile smooth muscle cells on a TiO<sub>2</sub> micro/nano interface: Towards benign pericytes environment for endothelialization," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 145, pp. 410–419, 2016.
- [36] D. Khang, J. Lu, C. Yao, K. M. Haberstroh, and T. J. Webster, "The role of nanometer and sub-micron surface features on vascular and bone cell adhesion on titanium," *Biomaterials*, vol. 29, no. 8, pp. 970–983, 2008.



